

BIOLOGISCHE WIRKUNG
EINES LIPOLYTISCHEN PEPTIDS
AUS SCHWEINEHYPOPHYSEN

Untersuchungen am Miniaturschwein und Kaninchen

Roland Hagen

1977

Dissertations- und Fotodruck Anneliese SCHUBERT
8 München 5 • Corneliusstraße 21 • Tel.: 268177

Aus der II. Medizinischen Klinik der Universität
München

(Kommissarischer Direktor: Prof.Dr.med. H.J.Karl)

BIOLOGISCHE WIRKUNG EINES LIPOLYTISCHEN PEPTIDS
AUS SCHWEINEHYPOPHYSEN

Untersuchungen am Miniaturschwein und Kaninchen

Inaugural-Dissertation
zur Erlangung der Doktorwürde in der gesamten Medizin
an der Ludwig Maximilians-Universität zu München

vorgelegt von
Roland HAGEN
aus Lustenau
München 1977

Mit Genehmigung des Fachbereichs Medizin
der Universität München

Berichterstatter: Professor Dr. med. P. Schwandt

Mitberichterstatter: Professor Dr. med. H. J. Karl

Dekan: Professor Dr. med. W. Spann

Tag der mündlichen Prüfung: 22. Dezember 1977



An dieser Stelle möchte ich Herrn Prof. Dr. med. H.J. Karl danken, der mir die Arbeit in den Laboratorien der Klinik ermöglichte.

Für die Überlassung des Themas und die zahlreichen Anregungen möchte ich Herrn Prof. Dr. med. P. Schwandt meinen herzlichen Dank aussprechen.

Bei Herrn Dr. med. M. Marshall, Dr. med. M. Schuck und Herrn A. Pietsch bedanke ich mich für die tatkräftige Unterstützung bei den zahlreichen Operationen.

Für die Bereitstellung der HANFORD-Miniaturschweine danke ich Herrn Prof. J. Kalich.

I. Einleitung	1
II. Material und Methoden	4
1. Peptid A	4
2. Versuchstiere	4
2.1 Hanford-Miniaturschwein	4
2.2 Narkose- und Operationstechnik	6
2.3 Kaninchen	8
2.4 In vivo Untersuchung	8
3. Serum-Untersuchungen	12
4. In vitro Versuche	13
5. Enzymbestimmungen	14
5.1 Herstellung der Enzymlösungen	14
5.2 Apparaturen, Materialien und Reagenzien	16
5.3 Bestimmung der Enzymaktivitäten	19
5.4 Bezugssysteme	21
5.5 Die Enzyme im einzelnen	22
6. Statistische Auswertung	31
III. Ergebnisse	33
1. In vivo Versuche	33
1.1 Langzeitkinetik Peptid A	33
1.2 Altersabhängigkeit der Peptid A-Wirkung	34
1.3 Altersabhängigkeit einiger physiologischer Parameter	34
2. In vitro Versuche	35
3. Enzymaktivitäten	35
3.1 Altersabhängigkeit der Enzymaktivitäten	35
3.2 Normalwerte von Enzymaktivitäten im Lebergewebe	35
3.3 Normalwerte von Enzymaktivitäten im subcutanen Fettgewebe	36
3.4 Enzymaktivitäten im subcutanen Fettgewebe des Miniaturschweins nach Peptid A	37

3.5 Enzymaktivitäten im perirenalen Fettgewebe und in der Leber von Kaninchen nach Peptid A	37
IV. Diskussion	38
1. Lipolytische Aktivität von Peptid A	38
2. Enzyme	41
2.1 Auswahl der Enzyme	41
2.2 Altersabhängigkeit der Enzymmuster	43
2.3 Einfluß von Peptid A auf die verschiedenen Enzyme	44
V. Zusammenfassung	47
VI. Tabellen	49
VII. Zeichnungen	62
VIII. Literaturverzeichnis	78
IX. Lebenslauf	

I. Einleitung

Bereits 1925 fanden COOPE und CHAMBERLIN (27), daß bei Ratten nach Gabe von Hypophysenextrakten der Fettgehalt der Leber zunahm. Ebenso wie BURNS und LING (20), ANSELMINO und HOFFMANN (4) und MAC TRIS vermuteten sie einen Einfluß der Hypophyse auf den Fettstoffwechsel.

Seither haben sich zahlreiche Arbeitsgruppen mit der Frage beschäftigt, ob ein spezielles lipotropes Hormon existiert. Diese Frage ist deswegen so schwer zu beantworten, weil auch zahlreiche andere Hypophysenhormone eine fettmobilisierende Wirkung haben (89, 122). In den letzten Jahren haben allerdings zahlreiche Gruppen Befunde zusammengetragen, die die Existenz eines eigenen, speziell auf den Fettstoffwechsel wirkenden Hormons sehr wahrscheinlich machen. Zusätzlich wurden auch aus Urin (10, 22, 59, 61, 130), Serum (51, 71, 74, 117), Zwischenhirn (52, 53) und Hypothalamus lipolytisch wirksame Substanzen gewonnen (93).

1961 isolierte ASTWOOD (7) aus Schweinehypophysen zwei lipidaktive Peptide (I und II). Die Existenz zweier lipolytisch aktiver Polypeptide wurde von GRAF et al (16, 47), RUDMAN et al (94) und der Arbeitsgruppe LI, LOHMAR und CHRETIEN (69, 26) bekräftigt.

1966 gelang es der Arbeitsgruppe LI, die Struktur der beiden, aus Schafhypophysen gewonnenen Lipotropine (γ -LPH und β -LPH) aufzuklären (69, 25).

DESRANLEAU et al (29) entwickelten 1972 den ersten spezifischen Radioimmun-Assay für β -LPH vom Schaf, mit einer Nachweisgrenze von ca. 0,5 ng/ml. Die mit dieser Methode gemessene β -LPH-Konzentration im Schafserum betrug ca. 10 ng/ml.

1975 berichtete GILKES et al (42) über einen Radioimmunsassay für β -Human-Melanocytenstimulierendes Hormon (β_{H} -MSH).

Dieser zeigte so starke Kreuzreaktionen mit gamma-LPH und beta-LPH, daß damit Lipotropine in Plasmaextrakten gemessen werden können. Im selben Jahr gelang es G. NEUREUTHER aus unserer Arbeitsgruppe (84) einen Radioimmunsassay für das lipotrope Peptid B aus Schweinehypophysen aufzubauen. Die untere Nachweisgrenze für diesen Assay lag bei 0,5 ng/ml.

In vorliegender Arbeit sollen nun einige grundlegende Parameter eines, von unserer Arbeitsgruppe aus Schweinehypophysen isolierten lipolytischen Polypeptids bestimmt werden und ein kleiner Ausschnitt der möglichen Angriffspunkte näher untersucht werden.

Das im weiteren als Lipotropin A bzw. Peptid A bezeichnete Polypeptid wurde in unserem Labor aus Schweinehypophysen (SCHWANDT et al (107) dargestellt.

Die auffallende Übereinstimmung in vielen Bereichen des Fett- und Kohlehydratstoffwechsels zwischen Schwein und Mensch veranlaßte uns, einen Großteil der Untersuchungen am HANFORD-Miniaturschwein vorzunehmen.

Nachdem mit der Implantation von Dauerkathetern die Voraussetzungen für streßfreie Blutentnahme geschaffen worden waren (77), führten wir Langzeitkinetiken mit verschiedenen Dosierungen von Peptid A durch.

Als Parameter der biologischen Wirksamkeit wurden dabei FFS- und FG-Spiegel zugrundegelegt.

Dabei sollten folgende Fragen beantwortet werden:

1. Ab welcher Dosis (ug/kg KGW) findet überhaupt eine meßbare lipolytische Reaktion statt (MED-"Minimal-Effectiv-Dosis")?

2. Ab welcher Dosis ist eine weitere Steigerung der Lipolyse nicht mehr möglich?
3. Mit welcher "sicher wirksamen Dosis" (SWD) soll bei weiteren detaillierten Versuchen gearbeitet werden?
4. Wie ist der zeitliche Verlauf der Lipolyse - insbesondere sollte der Zeitpunkt maximaler Lipolyse festgelegt werden?
5. Hat Peptid A einen Einfluß auf Enzymaktivitäten im Fettgewebe?

Die Enzymaktivitäten im Fettgewebe werden 60' nach Injektion von Lipotropin A gemessen und mit den Normalaktivitäten verglichen.

Diese Enzymuntersuchungen sollten als "screening" dienen und bei positiven Ergebnissen durch Substratmessungen mit gleichzeitiger Flowmessung ergänzt werden.

II. Material und Methoden

1. Peptid A

Dieses aus 58 Aminosäuren bestehende Polypeptid wurde in unserem Labor aus lyophilisierten Schweinehypophysen nach BONSNES und WHITE (13) und RUDMAN et al (93, 94, 96, 97) modifiziert und nach WEISWEILER (131, 132) gewonnen. Die Vorstufen von Peptid A wurden mit Fraktion H (105) und Fraktion J (131) bezeichnet.

Peptid A hat ein Molekulargewicht von 5 700; sein isoelektrischer Punkt liegt bei $P_H = 8,55$.

Für die Einheitlichkeit von Peptid A sprachen das einheitliche Verhalten bei Dünnschichtchromatographie, Elektrofokussierung, analytische Acrylamidgelelektrophorese, Säulenchromatographie (101) auf unterschiedlichen Austauschern und Gelen sowie die Immunpräzipitation.

2. Versuchstiere

2.1 Das HANFORD-Miniaturschwein

Die zunehmende Bedeutung des Miniaturschweins in der experimentellen Medizin hat viele Gründe. Einmal ergaben sich für viele Organsysteme Übereinstimmungen mit der Humanmedizin; besonders gilt dies für die Haut, das Gefäßsystem und den Fett- und KH-Stoffwechsel (57, 101, 135). Zum zweiten ist das Minipig ein relativ zahmes und robustes Versuchstier, das bei richtiger Pflege und optimaler Narkose- und Operationstechnik auch große Eingriffe gut übersteht (78).

2.1.1 Abstammung und Zucht des Miniaturschweins

Das HANFORD-Miniaturschwein entstand 1958 in den HANFORD-Laboratorien in den USA.

Primäres Ziel der Züchtung war es, ein kräftiges, weißes Miniaturschwein zum Studium der Einwirkung radioaktiver Strahlen zu entwickeln. Ausgangstiere der HANFORD-Rasse waren zwei PALOUSE-Jungsauen und ein PITMAN-MOORE-Eber. Die erste Generation wurde mit dem hellhäutigen Sumpfschwein aus Louisiana gekreuzt. Die Selektion des HANFORD-Stammes basierte auf folgenden Faktoren: Größe und Gewicht nach 140 Tagen, Körperbau, große Fruchtbarkeit, frühe Geschlechtsreife, Widerstandskraft gegen Umwelteinflüsse, Haut- und Haarfarbe, Haardichte und fügsames Wesen (56).

Das 140-Tage-Gewicht eines HANFORD-Minipigs beträgt bei voller Fütterung ca. 32 kg, das Durchschnittsgewicht dreijähriger Tiere ca. 76 kg, das Höchstgewicht ca. 90 kg (57).

Die durchschnittliche Trächtigkeitsdauer beträgt 111 Tage, das Geburtsgewicht um die 700 g. Die Tiere sind - mit Ausnahme der Fütterungszeiten - ruhig, relativ zahm und umgänglich und können nach Angaben von BUSTARD (19) ohne Schaden über 6 Jahre in geschlossenen Stallungen gehalten werden.

Die für meine Untersuchungen verwendeten Tiere wurden in Ställen von 0,9 x 1,75 m Grundfläche ohne Auslauf gehalten. Die Böden und Seitenwände waren wärmeisoliert. An den Hinterwänden befanden sich Wasserhähne, aus denen die Tiere ad libitum Wasser trinken konnten. Die Tiere erhielten zweimal täglich handelsübliches Schweinemastfutter (DLG-Schweinemastfutter II) (78). Bereits nach kurzer Zeit hatten sich die Tiere an die mit ihnen umgehenden Menschen gewöhnt, sodaß die Ställe jederzeit gefahrlos und ohne wesentliche Erregung der Tiere betreten werden konnten.

2.1.2 Die Untersuchungen wurden an folgenden Altersgruppen durchgeführt

- Gruppe I: Fünf Tiere im Alter von 14 Wochen mit einem Durchschnittsgewicht von $22 \pm 1,5$ kg
- Gruppe II: Neun Tiere im Alter zwischen 20 und 23 Wochen mit einem Durchschnittsgewicht von 31 ± 1 kg
- Gruppe III: Fünf Tiere im Alter von 3 Jahren mit einem Durchschnittsgewicht von 85 ± 6 kg.

2.2 Narkosetechnik und Operationsmethoden

2.2.1 Narkosetechnik

Alle Narkosen wurden mit einer Kombination aus dem Hypnotikum und Muskelrelaxans aus Metomidat (Hypnodil, JANSSEN-GmbH, Düsseldorf) und dem Sedativum Azaperon (Stresnil, JANSSEN-GmbH, Düsseldorf) durchgeführt (79).

Zur Narkoseeinleitung wurde Metomidat in einer Dosis von 10 - 15 mg/kg KGw, intraperitoneal injiziert; bei sehr schweren Tieren hat sich die langsame Injektion von 3 - 5 mg/kg KGw. in die Ohrvene bewährt. Bei Tieren mit bereits implantiertem Vorhofkatheter wurde Metomidat über diesen verabreicht. (78). Dieses Narkoseverfahren hat sich gegenüber anderen als überlegen erwiesen. Es bedarf keines besonderen präoperativen Aufwandes, die Narkose ist gut steuerbar und die Rate tödlicher Komplikationen wird mit etwa 10 % angegeben. In unserer Versuchsreihe starb ein einziges Tier und zwar bei der ersten Operation, also vor Versuchsbeginn. Während der Versuche kam kein Tier zu Tode.

2.2.2 Katheterimplantation

Für die vier Stunden dauernden kinetischen Untersuchungen, bei denen den Tieren mehrmals streßfrei Blut entnommen wurde, mußten wir den Tieren Verweilkatheter implantieren. Die verwendeten Katheter waren aus durchsichtigem Silikonkautschuk mit einem Außendurchmesser von 3,5 mm und einem Innendurchmesser von 1,5 mm. Sie wurden mit einer Silikonlösung bestrichen und 60° auf 160° C trocken erhitzt (M 14). Die Katheter wurden über die V. jugularis ext., die nach Längsschnitt über dem M. sternomastoideus etwas caudal des Kehlkopfes aufgesucht wurde etwa 15 - 18 cm eingeführt und subcutan zum Nacken verlegt. Die implantierten Katheter wurden alle ein bis zwei Tage mit physiologischer Kochsalzlösung gespült und mit 3,8 %iger Natriumzitratlösung gefüllt. Mit diesem Vorgehen konnten die Vorhofkatheter über Monate in beiden Richtungen offengehalten werden. Die Gewebeverträglichkeit des Kathetermaterials war sehr gut.

2.2.3 Gewebsentnahme

Zur Entnahme von subcutanem Bauchfett wurde über den, immer einige Tage zuvor implantierten Vorhofkatheter eine Kurznarkose mit Metomidat verabreicht. Nach einem etwa 4 cm großen Hautschnitt, paramedial und medial der 3. Mammae wurde aus der 2. Fettschicht je nach Versuchsansatz 2 - 3 g Fettgewebe entnommen und in einem eiskühlten Glasbecher sofort ins Labor zur weiteren Aufarbeitung gebracht.

Bei der mittleren Altersgruppe wurden für Enzymbestimmungen Lebergewebsstücke nach folgendem Vorgehen entnommen: Nach einem Paramedian-schnitt rechts wurde schichtweise die Bauchdecke eröffnet, das Peritoneum in üblicher Weise fixiert und der untere Leberpol vorsichtig nach unten gezogen. Etwa in einem Abstand von 1,5 cm wurden zwei atraumatische Fäden etwa 0,5 cm tief in den Lebertrand eingeknüpft. Zwischen diesen beiden Situationsnähten wurde ein keilförmiges Leberstück (0,6 bis 1 g Lebergewebe) mit der Schere entnommen, die Wundränder mit den Situationsnähten adaptiert und die Leberkapsel an der Ober- und Unterfläche mit atraumatischen Einzelknopfnähten verschlossen. Alle Tiere tolerierten diesen Eingriff gut.

2.3 Kaninchen

Als zweite Tierspezies verwendeten wir Kaninchen mit einem Durchschnittsgewicht von $3,8 \pm 0,8$ kg. Die Tiere waren mischrassig, beiderlei Geschlechts und wurden in Einzelkäfigen gehalten. Das Futter bestand aus Altrumin-Pellets und Wasser ad libitum.

2.4 In vivo Untersuchungen

Vor allen in vivo Versuchen wurden die Versuchstiere etwa 12 - 14 Stunden nüchtern gehalten. Die Versuche fanden stets in den Morgenstunden statt (Beginn ca. 7 - 8 Uhr).

2.4.1 In vivo Untersuchungen am Miniaturschwein

Am Anfang jeder Blutentnahme wurden etwa 2 ml Blut abgezogen und verworfen. Dann wurden jeweils zwischen 10 und 15 ml Blut entnommen, die zur weiteren Verarbeitung ins Labor gebracht

wurden. Um den Katheter über längere Zeit offen zu halten, wurde ca. 1 ml Natriumzitrat in den Katheter gegeben.

Nach Injektion der jeweiligen Substanz wurden ca. 20 ml isotone Kochsalzlösung nachgespritzt und bei der folgenden Blutentnahme die ersten 10 - 15 ml verworfen.

Die HANFORD-Miniaturschweine reagierten auch auf Versuche, die sich über Stunden hinzogen, ohne wesentliche Streßreaktionen!

2.4.1.1 Bei 20 - 23 Wochen alten Tieren mit einem Gewicht zwischen 26 kg und 32 kg wurden im Abstand von ca. 4 Tagen verschiedene Mengen Pept. A in den Vorhofkatheter injiziert (25 µg/kg bis 150 µg/kg) und zu folgenden Zeitpunkten Blut abgenommen: vor der Injektion und nach 10', 20', 30', 60', 90', 120', 180', 240' und 300'.

2.4.1.2 Auf der Basis der unter 2.4.1.1 gewonnenen Ergebnisse wurden sowohl bei den 14 Wochen wie auch bei den 3 Jahre alten Tieren vor und 60' nach der i.v. Gabe von Peptid A Blut entnommen.

2.4.1.3 Bei denselben Tieren (2.4.1.2) wurden einmal 60' nach 2 ml NaCl Gabe (via Katheter) und 60' nach Gabe von 100 µg Peptid A/kg Körpergewicht (gelöst in 2 ml NaCl - via Katheter) Gewebssproben aus dem subcutanen Bauchfett entnommen. Dabei versuchten wir die Proben jeweils aus der zweiten Fettschicht zu gewinnen.

2.4.2 In vivo Untersuchungen am Kaninchen

2.4.2.1 Für die Langzeitkinetiken an den Kaninchen wurden die Tiere zur Blutentnahme jeweils in spezielle Holzkästen gesetzt, die das Tier so fixierten, daß relativ mühelos die Ohrvene punktiert werden konnte. Nach einer Blutentnahme aus der Ohrvene als Ausgangswert wurden 100 µg Peptid A/kg Körpergewicht, in 2 ml NaCl gelöst, subcutan zwischen die Schulterblätter injiziert. Als Kontrolle wurden bei einigen Tieren nur NaCl 2 ml subcutan an gleicher Stelle verabreicht. Anschließend wurden nach 10', 20', 30', 60', 90', 120', 180', 240' und 300' Blut an der Ohrvene entnommen und zur Bestimmung von FFS und FG ins Labor gebracht.

2.4.2.2 Für die Enzymmessungen wurden aus einem Kollektiv von 15 Hasen sieben Tiere durch Los bestimmt, die als Kontrollgruppe dienen sollten. Diese Tiere wurden 60' nach subcutaner Injektion von 2 ml NaCl durch Genickschlag getötet, der Bauchraum eröffnet, die Nierenlager dargestellt und perirenales Fettgewebe entnommen. Gleichzeitig wurde von einer Assistentin ein ca. 3 g schweres Leberstück durch Keilexcision herausgeschnitten. Beide Gewebeproben wurden sofort in ein eisgekühltes Gefäß gelegt und zur weiteren Verarbeitung ins Labor gebracht. Bei den anderen acht Tieren wurden jeweils 60' vor der Tötung 100 µg/kg

Körpergewicht Peptid A in 2 ml NaCl subcutan ebenfalls zwischen die Schulterblätter injiziert. Das weitere Vorgehen entsprach dem bei Kontrolltieren.

3. Serumuntersuchungen

3.1 Freie Fettsäuren (FFS) - nach DOLE Und MEINERTZ (34)

Die jeweils eingesetzte Serummengende betrug 0,5 bzw. 1,0 ml. Als Standard diente ein Gemisch aus Palmitin-, Stearin-, Myristin- und Laurinsäure in n-Heptan (jeweils 1 mval/l).

Als Indikator verwendeten wir gewaschenes Nilblau A nach GORDON (44a).

3.2 Freies Glycerin

Bestimmungsmethode nach EGGSTEIN und KREUTZ (35)

3.3 Triglyceride

Nach Verseifung in alkoholischer KOH (KOH 0,5 n; C_2H_5OH 25 m) erfolgte die Bestimmung des freien Glycerins ebenfalls nach EGGSTEIN und KREUTZ (35)

3.4 Glukose

Mit der o-Toluidin-Methode nach KREUTZ (66)

(im Autoanalyser Technikon)

3.5 Insulin

Radioimmunologisch im Triplikate (Doppelantikörpermethode nach HALEY und RANDLE (49) mit dem "Insulin Immunoassay Kit" der Fa. BUCHLER, Braunschweig. Der dritte Schritt der Bestimmung, die Filtration über Membranfilter, wurde in unserem Labor automatisiert.

Unter Berücksichtigung der Arbeiten von HENDERSON J.R. (50) und LIND et al (70) wurden die Bestimmungen im Serum durchgeführt.

4. In vitro Versuche

4.1 Apparaturen und Materialien

Warburg-Apparatur (Fa. Braun, Mehringen)

Warburg-Gefäße (Fa. Braun, Mehringen)

Rinderalbumin (reinst, Fa. Behring-Werke, Marburg)

Krebs-Ringer-Bicarbonatpuffer, pH 7,4 mit folgender Zusammensetzung:

- NaCl 106 mMol/l; NaHCO_3 40 mMol/l, KCl 5,4 mMol/l, CaCl 1,0 mMol/l, KH_2PO_4 1,0 mMol/l, MgSO_4 1,0 mMol/l, Carbogen (95 % O_2 und 5 % CO_2)

Peptid A (genaue Beschreibung unter 2.1)

ACTH vom Schwein (Fa. Schering, Berlin)

4.2 Präparation

Die Fettgewebeproben wurden nach der Entnahme sofort in NaCl-Lösung ins Labor transportiert. Nach kurzem Abspülen mit physiologischer Kochsalzlösung, Abpräparieren größerer Gefäße und kurzem Trocknen wurden Stücke zu je 100 mg abgewogen.

4.3 Inkubation

Diese 100 mg schweren Fettstückchen wurden über 3 Std. in einem Warburg-Gefäß in 3 ml Albumin-Krebs-Ringer-Bikarbonat-Puffer inkubiert. Das Rinderalbumin, das in der Konzentration 30 mg/ml Puffer gelöst war, wurde zuvor nach CAMPBELL fettsäurefrei gewaschen. Durch die Warburg-Gefäße wurde ein Gemisch von 95 % O_2 und 5 % CO_2 (Carbogen) geleitet. Anschließend wurden die Gefäße luftdicht verschlossen und 3 Std. bei einer Temperatur von 37° C (Wasserbad) mit einer Frequenz von

60 Min $^{-1}$ und einer Amplitude von 2 cm in der Warburg-Apparatur geschüttelt.

4.4 Bestimmung des freigesetzten Glycerins und der FFS

4.4.1 Bestimmung des freigesetzten Glycerins

Aus 0,2 ml Extraktionsmedium wurde in einer Doppelbestimmung (jeweils 0,1 ml/Testansatz) die Konzentration an freiem Glycerin nach der Methode von EGGSTEIN und KREUTZ (K 32) bestimmt. Die Ergebnisse werden in μ Mol/100 mg Fettgewebe 1 Std. angegeben.

4.4.2 Bestimmung der FFS

Ebenfalls als Doppelbestimmung wurde die FFS-Konzentration im Extraktionsmedium nach DOLE und MEINERTZ gemessen. Die Ergebnisse werden in μ Val/100 mg Fettgewebe 3 Std. angegeben.

Die Berechnungen wurden mit dem Tischcomputer Programm 101 (Fa. Olivetti) nach selbsterstellten Programmen durchgeführt.

5. Enzymbestimmungen

5.1 Herstellung der Enzymlösungen

5.1.1 Das subcutane Fettgewebe bzw. die Leberstücke der Miniaturschweine wurden sofort nach dem jeweiligen Eingriff in einem eisgekühlten Gefäß zur weiteren Verarbeitung ins Labor gebracht. Dort wurde das Gewebe (besonders Fettgewebe) vom anhaftenden Blut gereinigt, große Gefäße oder Bindegewebsstränge wurden abpräpariert. Anschließend wurde das Untersuchungsmaterial mit einer Schere zerkleinert und zur Erstellung der jeweiligen Testlösung abgewogen. Die Extraktionsmedien waren auf 4° C vorgekühlt.

5.1.2 Folgende Homogenate wurden hergestellt

(nach DOERR - 33)

5.1.2.1 Zur Messung der Phosphodiesterasaktivität

Zu einem Teil Fettgewebe kamen 2 Teile Extraktionsmedium bzw. zu einem Teil Lebergewebe kamen 9 Teile E. medium mit der Zusammensetzung: TRIS-Puffer 0,02 M, pH = 7,4!

5.1.2.2 Zur Messung des "Malic Enzym" (ME) und Citrat Cleavage Enzyms (CCE):

Zu einem Teil Fettgewebe kamen 9 Teile Extraktionsmedium bzw. zu 1 Teil Leber 19 Teile Extraktionsmedium mit der Zusammensetzung TRA-HCl-Puffer 0,01 M, KCl 0,15 M, EDTA 0,001 M, Ph = 7,4!

5.1.2.3 Zur Messung der Aktivität von Glucose-6-Phosphatdehydrogenase, 6-Phosphoglukonatdehydrogenase, Glukophosphomutase, Hexokinase, Glukokinase (Leber!), Phosphofruktokinase, Pyrovatkinase, Glycerin-1-Phosphatdehydrokinase, Malatdehydrokinase, Glutamat-Pyruvat-Transaminase, Glutamat-Oxalacetat-Transaminase und Glutamatdehydrogenase wurde 1 Teil Fettgewebe mit 9 Teilen Extraktionsmedium bzw. 1 Teil Lebergewebe mit 19 Teilen Extraktionsmedium mit der unter 5.1.2.2 genannten Zusammensetzung verwendet.

5.1.3 Alle Gewebe wurden anschließend in den jeweiligen Extraktionsmedien mit einem Homogenisator nach Potter-Elvehjem (Füllvolumen 30 ml) mit Teflonstempel 1,5 Min unter Eiskühlung homogenisiert (sog. Vollhomogenat) (33).

5.1.4 Zentrifugation

Zur Bestimmung der Transaminasen (GPT, GOT, Glu-DH) wurden 0,5 ml Vollhomogenat entnommen, mit Aqua bidest ad 2 ml verdünnt

und bei 6000 g x 10 Minuten in einer Kühlzentrifuge (Spinco-L-Beckmann, München) bei 4 °C zentrifugiert.

Das Vollhomogenat zur Phosphodiesterase-Bestimmung wurde in einer Ultrazentrifuge (Spinco-L-Beckmann, München) 20 Min. bei 100 000 g in einem vorgekühlten Winkelrotor (Typ 30) bei t = 4 °C zentrifugiert.

Das Vollhomogenat für die unter 5.1.2.3 und 5.1.2.2 genannten Enzyme wird ebenfalls in der Ultrazentrifuge (Spinco-L-Beckmann, München) bei 100 000 g in einem vorgekühlten Winkelrotor (Titanium Angle Rotor; Kat.- Nr.59593) bei t = 4 °C über 30 Min. zentrifugiert.

Der partikelfreie, klare Überstand oberhalb des Sediments und unterhalb der Fettschicht wurde vorsichtig mit einer Spritze abgezogen. Dabei wurde besonders darauf geachtet, daß weder Anteile des Sediments noch der Fettschicht aufgewirbelt wurden. Der Inhalt der Spritze wurde dann in ein vorgekühltes Gefäß gefüllt und bis zu den jeweiligen Enzymtests im Eisbad gehalten. Ein Teil davon wurde für die Bestimmung des Extraktproteins eingefroren und in der Tiefkühltruhe aufbewahrt.

5.2 Apparaturen, Materialien und Reagenzien

5.2.1 Apparaturen

Glashomogenisator (30 ml) nach POTTER-ELVEJHEN
mit Teflon-Stempel

Labor pH-Meter (Fa. Knick, Berlin)

Kühlzentrifuge (Fa. Christ, Osterode)

Ultrazentrifuge: Spinco-L-Beckmann, München

Winkelrotor: Typ 30 (Plastik-Röhrchen)

Spektrophotometer Fa. Zeiss PM 4
Schreibgerät "Servogor" ("RE 511" Fa. Metrawatt,
Nürnberg)
Normalküvetten, 1 cm Schichtdicke, Füllvolumen
4,5 ml
Halbmikroküvetten aus UV-Licht-durchlässigem
Quarzglas 0,5 cm Schichtdicke, 2,5 ml Füllvolumen
Thermostat F-Junior (Fa. Haake, Berlin)
Marburg Pipetten (5 u, 10 u, 20 u, 50 u, 100 u,
200 u, 500 u)
Olivetti-Tischcomputer (Fa. Olivetti, Programma 101)
Filterpapier Whetman Nr. 1

5.2.2 Puffer

Die Puffer wurden aus der Apotheke der Münchner
Universitätskliniken (Links der Isar) p.a. bezo-
gen, vor Gebrauch auf ihren pH-Wert überprüft
und ggf. mit HCl oder KOH nachgestellt.

Im einzelnen verwendeten wir folgende Puffer:

TRA-HCl-Puffer: 0,01 M; KCl 0,15 M; EDTA 0,001 M;
pH = 7,4

TRA-HCl-Puffer 0,1 M; EDTA 0,01; pH = 7,5

TRA-HCl-Puffer 0,2 M; pH = 7,5

(Fa. Merck, Best.-Nr. 4136, 8379, 8418)

TRIS-HCl-Puffer 0,02 M; pH = 7,4

TRIS-HCl-Puffer 0,33 M; pH = 7,4

TRIS-HCl-Puffer 0,163 M; pH = 7,4

TRIS-HCl-Puffer 0,3 M; pH = 7,5

(Fa. Merck, Best. Nr. 8382)

Citrat-Puffer 0,1 M; pH = 6,5

$K_2HPO_4/K_2H_2PO_4$ -Puffer 0,1 M; pH = 7,4

Hydrazin-Glykokoll-Puffer (WIELAND und SUYTER) (134)

Hydrazin 1 M, Glykokoll : 0,2 M, Mg^{++} : 0,002 M, pH = 9,8

(Fa. Merck, Best.-Nr. 4600, 4201, 5883)

KOH 1 n

HCl 1 n

5.2.3 Enzyme und Nucleotide (Fa. Boehringer)

	<u>Bestell-Nr.</u>
Adenosin-Desaminase	15 846 EAAC
Aldolase	15 419 EAAF
Alkalische Phosphatase	15 436 EPAC
Glucose-6-Phosphatdehydrogenase	15 303 EGAE
Glycerin-1-Phosphatdehydrogenase	15 135 EGAQ
Lactatdehydrogenase	15 371 ELAC
Malatdehydrogenase	15 048 EMAA
Nikotin-Adenin-Dinukleotid	15 300 CNAA
Nikotin-Adenin-Dinukleotid- phosphat	15 600 CNAF
Nikotin-Adenin-Dinukleotid, reduziert	15 142 CNAB
Phosphoglucose-Isomerase	15 433 EPAN
Triosephosphat-Isomerase	15 333 ETAA

5.2.4 Substrate (Fa. Boehringer)

Adenosin-5'-Diphosphat	15 014 NAAG
Adenosin-5'-Triphosphat	15 028 NAAH
Adenosin-3', 5'-Monophosphat- säure	15 076 NAAE

KOH, (pH - 7,4)

Dehydroxyacetonphosphat-Dimethyl- ketal	15 401 SDAA
--	-------------

Herstellung nach FISCHER (36a):

20 mg der Substanz werden in 2.0 ml H₂O gelöst und mit 0,4 ml Dowex 50 (X 8; -200 - 400 mesh; H⁺ - Form) versetzt. Nach kräftigem Schütteln der Mischung (1 Min.) wird der pH auf 1,5 nachgestellt und die Lösung vom Austauscherharz in einen Kolben abgesaugt. Das gut verschlossene Gefäß wird 6 Stunden bei 40 °C gehalten. Das Dihydroxyacetonphosphat wird anschließend enzymatisch geprüft.

Fructose-1,6-Diphosphat	15 294 SFAE
-------------------------	-------------

Fructose-6-Phosphat	15 172 SFAD
---------------------	-------------

Gluconat-6-Phosphat	15 176 SGAD
---------------------	-------------

Glucose-1-Phosphat	15 085 SGAQ
--------------------	-------------

Glucose-6-Phosphat	15 307 SGAK
--------------------	-------------

Oxalessigsäure	15 188
----------------	--------

Die Substanz wurde erst kurz vor Gebrauch in H₂O gelöst.

(Enzymatische Überprüfung nach HOHORST und REIM (51a).

Phosphoenolpyruvat	15 308
--------------------	--------

5.3 Bestimmung der Enzymaktivitäten

Alle Enzymaktivitäten werden im optischen Test gemessen (18). Die Extinktionsmessungen für G-6-PDH, 6-PDGH, GPM, HK, PFK, GDH, GK, MDH, GPT, GOT und GluDH wurden im Zeiss-Spektral-Photometer bei einer Wellenlänge von $\lambda = 366$ nm und einer Spaltbreite von $S = 7 \times 12$ mm durchgeführt.

Bestimmung nach einem von SRERE (120) angegebenen
Prinzip:

$\text{Citrat} + \text{CoA} + \text{ATP} \rightarrow \text{Acetyl-CoA} + \text{Oxalacetat} + \text{ADP} + \text{P}$
 $\text{Oxalacetat} + \text{NADH} + \text{H}^+ \rightarrow \text{Malat} + \text{NAD}^+$ (Hilfsreaktion
mit Malatdehydrogenase (MDH)).

Testzusammensetzung (nach KORNACKER und BALL) (63):

TRIS	33,3 mM, pH = 7,4	K-Citrat	10 mM
MgCl ₂	10 mM	MDH	10 µg
BAL	10 mM	NADH	0,08 mM
KCN	1 mM		

Gewebeextrakt 0,5 ml

Start mit ATP 5 mM.

5.5.12 Glukophosphomutase

(alpha-D-Glukose-1,6-Diphosphat: alpha-D-Glukose-1-
phosphat phosphotransferase; EC 2.7.5.1.)

Reaktion: $\text{Glukose-6-Phosphat} + \text{Glukose-1,6-Diphosphat} =$
 $\text{Glukose-6-Phosphat} + \text{Glukose-1,6-Diphosphat}$

Aktivitätsbestimmung nach KLENOW und EMBERLAND (62):

$\text{Glukose-6-Phosphat} + \text{Glukose-1,6-Diphosphat} \rightarrow \text{Glukose-6-Phosphat} + \text{Glukose-1,6-Diphosphat}$

$\text{Glukose-6-Phosphat} + \text{NADP}^+ \rightarrow \text{6-Phosphoglukonat} + \text{NADPH} + \text{H}^+$ (Hilfsreaktion mit Glukose-6-Phosphatdehydroge-
nase (G-6-PDH))

Testzusammensetzung (nach PETTE et al. (87))

TRAP	50 mM	NADP	0,3 mM
EDTA	5 mM	Glukose-6-Phosphat	8 mM
MgSO ₄	8 mM		
pH = 7,5			

Gewebeextrakt 0,3 ml G-6-PDH 730 mU/ml Testvolumen
Start durch Zugabe von Glukose-6-Phosphat.

5.5.13 Glutamatoxalacetattransaminase

(L-Aspartat: 2-oxoglutarat aminotransferase; EC
2.6.1.1.):

Reaktion: L-Aspartat + alpha-Ketoglutarat = Oxalacetat +
L-Glutamat

Reaktionsbestimmung nach KARMEN et al. (58) ausgear-
beitet:

L-Aspartat + alpha-Ketoglutarat → Oxalacetat + L-Gluta-
mat,

Oxalacetat + NADH + H⁺ → L-Malat + NAD⁺ (Hilfsreaktion
mit Malatdehydrogenase (MDH)).

Testzusammensetzung (nach PETTE et al.) (87):

KH ₂ PO ₄ /K ₂ HPO ₄	100 mM	α-Ketoglutarat	5 mM
EDTA	5 mM	L-Aspartat	30 mM
NADH	0,22 mM	MDH 730 mU/ml	Testvolumen
Gewebeextrakt 0,5 ml			

Start durch L-Aspartat.

5.5 Die Enzymtests im einzelnen

5.5.1 Hexokinase

(ATP: D-hexose-6-phosphotransferase; EC

2.7.1.1.)

Reaktion: $\text{ATP} + \text{Hexose} = \text{Hexose-6-Phosphat} +$

ATP ; Aktivitätsbestimmung nach SLEIN et al

(119): $\text{Glukose} + \text{ATP} \rightarrow \text{Glukose-6-Phosphat} +$

ADP

$\text{Glukose-6-Phosphat} + \text{NADP}^+ \rightarrow \text{6-Phosphoglukosonsäure}$

$\text{NADPH} + \text{H}^+$ (Hilfsreaktion mit Glukose-6-Phosphat-dehydrogenase (G-6-PDH)).

Testzusammensetzung (nach BÜCHER et al. (18):

TRAP	50 mM	Adenosintriphosphat	1,5 mM
------	-------	---------------------	--------

EDTA	5 mM	D(+) Glukose	2 mM
------	------	--------------	------

MgSO ₄	8 mM	G-6-PDH	730 mU/ml
			Testvolumen

NADP 0,3 mM pH = 7,5

Start mit 0,5 ml Gewebeextrakt

5.5.2 Glukokinase

(Leber)

(ATP: D-Glukose-6-phosphotransferase; EC 2.7.1.2)

Reaktion: $\text{ATP} + \text{Glukose} \rightarrow \text{ADP} + \text{Glukose-6-Phosphat} + \text{H}^+$

Aktivitätsbestimmung nach DI PIETRO et al. (30)

$\text{Glukose} + \text{ATP} \rightarrow \text{Glukose-6-Phosphat} + \text{ADP}$

Testzusammensetzung modifiziert nach PARRY und WALKER):

TRAP	50 mM	ATP	3 mM
------	-------	-----	------

EDTA	5 mM	D(+) Glukose	100 mM
------	------	--------------	--------

MgSO ₄	8 mM	Glukose-6-PDH	730 mU/ml
			Testvolumen

NADP 0,3 mM pH = 7,5

Start mit 0,1 ml Gewebeextrakt

5.5.3 Phosphofruktokinase (ATP: D-Fruktose-6-Phosphate
1-Phosphotransferase; EC 2.7.1.11)

Reaktion: Fruktose-6-Phosphat + ATP $\rightleftharpoons$ Fruktose-
1,6-Diphosphat + ADP

Aktivitätsbestimmung nach RACKER (90)

Fruktose-6-Phosphat + ATP $\rightarrow$ Fruktose-1,6-Diphosphat
Dihydroxyacetonphosphat + Glyceraldehyd-3-Phosphat (1),
Glyceraldehyd-3-Phosphat $\rightarrow$ Dihydroxyacetonphosphat (2)
2 Dihydroxyacetonphosphat + 2 NADH + 2 H⁺ $\rightarrow$ 2 Glycerin-
1-Phosphat + 2 NAD⁺ (3)

Hilfsreaktion (1) mit Aldolase

Hilfsreaktion (2) mit Triosephosphatisomerase (TIM)

Hilfsreaktion (3) mit Glycerin-1-Phosphatdehydrogenase
(GDH)

Pro Phosphatübertragung werden zwei Äquivalente an
NADH oxydiert.

Testzusammensetzung (nach BUCHER et al. (18))

TRAP	50 mM	Fruktose-6-Phosphat	1,6 mM
EDTA	5 mM	Aldolase	730 mU/ml Testvolumen
MgSO ₄	8 mM		
NADH	0,22 mM	TIM	1460 mU/ml Testvolumen
ATP	1,5 mM	GDH	2200 mU/ml Testvolumen

pH = 7,5

Start durch 0,5 ml Gewebeextrakt

6.3.2 Vergleich der Mittelwerte mit dem t-Test nach STUDENT:

a) bei signifikant verschiedenen Varianzen:

$$t = \frac{\bar{x} - x}{\sqrt{\frac{s_{x1}^2}{n_1} - \frac{s_{x2}^2}{n_2}}}$$

β) bei nicht signifikant verschiedenen Varianzen:

$$t = \frac{\bar{x} - x}{\sqrt{\frac{s_{x1}^2 + s_{x2}^2}{n_1 + n_2 - 2} \cdot \frac{1}{n_1} + \frac{1}{n_2}}}$$

6.3.3 Signifikanzzahlen:

(für den zweiseitigen Test: $2\alpha = 0,01$ bzw. $0,05$)

für den einseitigen Test: $\alpha = 0,01$ bzw. $0,05$

für den Test auf Nichtnormalität: $\alpha = 0,2$

Die 2 P (bzw. P) Werte wurden in den "Wissenschaftlichen Tabellen", Documenta Geigy (Basel) (32) abgelesen.

III. Ergebnisse:

1. In vivo Versuche:

1.1 Langzeitkinetik bei Miniaturschweinen (über 5 Stunden) und Kaninchen (über 4 Stunden)

Wie aus Abb. 1 und 2 und Tabelle I und II hervorgeht, steigen beim Miniaturschwein nach der i.v. Gabe von Peptid A sowohl die freien Fettsäuren (FFS) als auch das freie Glycerin (FG) im Serum dosisabhängig an. Die maximalen Konzentrationen werden jeweils 30' bis 60' p.i. erreicht. Anschließend kommt es zu einem steilen Abfall bis 120' p.i., der gefolgt ist von einem langsamen Abfall, so daß nach 5 Stunden in etwa - je nach Dosis - der Ausgangspunkt wieder erreicht ist.

Während das FG nach 150 µg/kg Körpergewicht Peptid A nicht wesentlich mehr ansteigt als nach 100 µg/kg Körpergewicht Peptid A, es in der "Dosiswirkungskurve" also zu einem Plateau kommt (Abb. 3), steigen die FFS bei 150 µg/kg Körpergewicht noch deutlich stärker an als nach der Gabe von 100 µg/kg Körpergewicht! In der Dosiswirkungskurve für FFS ist bei 150 µg/kg Körpergewicht noch kein Plateau zu erkennen.

Zu keinem Zeitpunkt und mit keiner von uns verwendeten Dosis konnten signifikante Veränderungen der Glucose- oder Insulinkonzentrationen erreicht werden (Tab. III und IV).

Beim Kaninchen entsprach das Verhalten von FFS und FG dem beim Miniaturschwein, wobei allerdings die Absolutwerte etwas höher lagen als beim Minipig (Tab. V und VI). Wiederum wurden die Maximalwerte nach 60' erreicht. Mit 100 µg/kg

5.5.8 Glycerokinase

(ATP: glycerol phosphotransferase; EC 2.7.1.30)

Reaktion: Glycerin + ATP = L-Glycerin-3-Phosphat + ADP, Aktivitätsbestimmung nach WIELAND und SUYTER (134):

Glycerin + ATP $\rightarrow$ L-Glycerin-1-Phosphat + ADP
L-Glycerin-3-Phosphat + NAD^+ $\rightarrow$ Dihydroxyacetonphosphat + NADH + H^+ (Hilfsreaktion mit Glycerin-1-Phosphatdehydrogenase (GDH).

Dihydroxyacetonphosphat + Hydrazin $\rightarrow$ Hydrazon
(Puffer)

Testzusammensetzung (nach WIELAND und SUYTER) (134):

Hydrazin-Glykokoll-Puffer pH = 9,8

(Hydrazin 1 M, Glykokoll 0,2 M, MgCl_2 0,002 M)

ATP 1,9 mM Glycerin 2,5 mM

NAD 0,5 mM GDH 4000 mU/ml Testvolumen

Gewebeextrakt 0,5 ml.

Start mit Glycerin.

5.5.9 Malatdehydrogenase

(L-Malate: NAD oxidoreductase; EC 1.1.1.37):

Reaktion: Oxalacetat + NADH + H^+ = L-Malat + NAD^+

Aktivitätsbestimmung nach MEHLER et al. (80).

Testzusammensetzung (nach DELBRÜCK et al.) (28):

TRAP 50 mM NADH 0,22 mM

EDTA 5 mM Oxalacetat 0,2 mM

pH = 7,5

Gewebeextrakt 0,02 ml.

Die Reaktion wird durch Zugabe von Oxalacetat gestartet. Das verwendete Substrat wurde frisch gelöst. Die gewählte Konzentration des Oxalacetats liegt im Substratoptimum des extramitochondrialen Enzyms.

5.5.10 "Malic Enzyme"

(L-Malat: NAD oxidoreductase; EC 1.1.1.38)

Reaktion: $\text{L-Malat} + \text{NADP}^+ = \text{Pyruvat} + \text{CO} + \text{NADPH} + \text{H}^+$

Aktivitätsbestimmung nach PETTE et al. (89):

TRAP 50 mM NADP 0,3 mM

EDTA 5 mM L-Malat 2 mM

MgSO₄ 8 mM

pH = 7,5

Gewebeextrakt 0,5 ml

Testzusammensetzung (nach RUTTER) (100):

TRIS 0,3 M NADP 2 mM

MgSO₄ 10 mM L-Malat 1 mM

pH = 7,4 - 8,5

Gewebeextrakt 0,5 ml

Start durch L-Malat.

5.5.11 Citrate Cleavage Enzyme

(ATP: Citrate oxaloacetatlyase; EC 4.1.3.8)

Reaktion: $\text{Ditrat} + \text{CoA} + \text{ATP} = \text{Acetyl-CoA} + \text{Oxalacetat} + \text{ADP} + \text{Phosphat}$

Bestimmung nach einem von SRERE (120) angegebenen

Prinzip:

$\text{Citrat} + \text{CoA} + \text{ATP} \rightarrow \text{Acetyl-CoA} + \text{Oxalacetat} + \text{ADP} + \text{P}$
 $\text{Oxalacetat} + \text{NADH} + \text{H}^+ \rightarrow \text{Malat} + \text{NAD}^+$ (Hilfsreaktion
mit Malatdehydrogenase (MDH)).

Testzusammensetzung (nach KORNACKER und BALL) (63):

TRIS	33,3 mM, pH = 7,4	K-Citrat	10 mM
MgCl ₂	10 mM	MDH	10 µg
BAL	10 mM	NADH	0,08 mM
KCN	1 mM		

Gewebeextrakt 0,5 ml

Start mit ATP 5 mM.

5.5.12 Glukophosphomutase

(alpha-D-Glukose-1,6-Diphosphat: alpha-D-Glukose-1-phosphat phosphotransferase; EC 2.7.5.1.)

Reaktion: $\text{Glukose-6-Phosphat} + \text{Glukose-1,6-Diphosphat} =$
 $\text{Glukose-6-Phosphat} + \text{Glukose-1,6-Diphosphat}$

Aktivitätsbestimmung nach KLENOW und EMBERLAND (62):

$\text{Glukose-6-Phosphat} + \text{Glukose-1,6-Diphosphat} \rightarrow \text{Glukose-6-Phosphat} + \text{Glukose-1,6-Diphosphat}$

$\text{Glukose-6-Phosphat} + \text{NADP}^+ \rightarrow \text{6-Phosphoglukonat} + \text{NADPH} + \text{H}^+$ (Hilfsreaktion mit Glukose-6-Phosphatdehydrogenase (G-6-PDH))

Testzusammensetzung (nach PETTE et al. (87))

TRAP	50 mM	NADP	0,3 mM
EDTA	5 mM	Glukose-6-Phosphat	8 mM
MgSO ₄	8 mM		
pH = 7,5			

Gewebeextrakt 0,3 ml G-6-PDH 730 mU/ml Testvolumen
Start durch Zugabe von Glukose-6-Phosphat.

5.5.13 Glutamatoxalacetattransaminase

(L-Aspartat: 2-oxoglutarat aminotransferase; EC
2.6.1.1.):

Reaktion: L-Aspartat + alpha-Ketoglutarat = Oxalacetat +
L-Glutamat

Reaktionsbestimmung nach KARMEN et al. (58) ausgear-
beitet:

L-Aspartat + alpha-Ketoglutarat → Oxalacetat + L-Gluta-
mat,

Oxalacetat + NADH + H⁺ → L-Malat + NAD⁺ (Hilfsreaktion
mit Malatdehydrogenase (MDH)).

Testzusammensetzung (nach PETTE et al.) (87):

KH ₂ PO ₄ /K ₂ HPO ₄	100 mM	α-Ketoglutarat	5 mM
EDTA	5 mM	L-Aspartat	30 mM
NADH	0,22 mM	MDH 730 mU/ml	Testvolumen
Gewebeextrakt 0,5 ml			
Start durch L-Aspartat.			

5.5.14 Glutamatpyruvattransaminase

(L-Alanin: 2-oxoglutarataminotransferase; EC 2.6.1.2)

Reaktion: L-Alanin + alpha-Ketoglutarat = Pyruvat +
L-Glutamat

Reaktionsbestimmung nach PFLEIDERER et al. (88) so
angegeben:

L-Alanin + alpha-Ketoglutarat → Pyruvat + L-Glutamat
Pyruvat + NADH + H⁺ → Lactat + NAD⁺ (Hilfsenzym:
Lactatdehydrogenase (LDH)).

Testzusammensetzung (DELBROCK et al.) (28), für das
Fettgewebe modifiziert):

KH ₂ PO ₄ /K ₂ HPO ₄	100 mM	alpha-Ketoglutarat	7 mM
EDTA	5 mM	L-Alanin	280 mM
NADH	0,22 mM	(DELBROCK et al:	40 mM)
		LDH 730 mU/ml	Testvolumen

pH = 7,4

Gewebeextrakt 0,5 ml

Start durch L-Alanin.

6. Statistische Auswertung

Soweit dies bei der geringen Fallzahl möglich war, wurden die statistischen Berechnungen nach folgenden Formeln vorgenommen:

6.1 Definitionen:

n = Fallzahl

$$\bar{x} = \frac{x_1 + x_2 + \dots + x_n}{n} \quad \text{Mittelwert}$$

$$s_x = \sqrt{\frac{\sum (x - \bar{x})^2}{n - 1}} \quad \text{Standardabweichung des Einzelwertes } x$$

$$s_{\bar{x}}^2 = \text{Streuung (Varianz) des Einzelwertes } x$$

$$s_{\bar{x}} = \sqrt{\frac{s_x^2}{n}} \quad \text{Standardabweichung des Mittelwertes } \bar{x}$$

$$VK = \frac{s_x}{\bar{x}} \cdot 100 \quad \text{Variationskoeffizient}$$

6.2 Prüfung auf Nichtnormalität:

mit dem Kolmogoroff-Smirnow-Test (ϵ^2).

6.3 Signifikanzberechnungen:

6.3.1 Vergleich der Varianzen

mit der F-Verteilung nach FISCHER:

$$F = \frac{s_{x1}^2}{s_{x2}^2}$$

6.3.2 Vergleich der Mittelwerte mit dem t-Test nach STUDENT:

a) bei signifikant verschiedenen Varianzen:

$$t = \frac{\bar{x} - x}{\sqrt{\frac{s_{x1}^2}{n_1} - \frac{s_{x2}^2}{n_2}}}$$

β) bei nicht signifikant verschiedenen Varianzen:

$$t = \frac{\bar{x} - x}{\sqrt{\frac{s_{x1}^2}{n_1} + \frac{s_{x2}^2}{n_2} - 2 \cdot \frac{1}{n_1} + \frac{1}{n_2}}}$$

6.3.3 Signifikanzzahlen:

(für den zweiseitigen Test: $2\alpha = 0,01$ bzw. $0,05$)

für den einseitigen Test: $\alpha = 0,01$ bzw. $0,05$

für den Test auf Nichtnormalität: $\alpha = 0,2$

Die 2 P (bzw. P) Werte wurden in den "Wissenschaftlichen Tabellen", Documenta Geigy (Basel) (32) abgelesen.

III. Ergebnisse:

1. In vivo Versuche:

1.1 Langzeitkinetik bei Miniaturschweinen (über 5 Stunden) und Kaninchen (über 4 Stunden)

Wie aus Abb. 1 und 2 und Tabelle I und II hervorgeht, steigen beim Miniaturschwein nach der i.v. Gabe von Peptid A sowohl die freien Fettsäuren (FFS) als auch das freie Glycerin (FG) im Serum dosisabhängig an. Die maximalen Konzentrationen werden jeweils 30' bis 60' p.i. erreicht. Anschließend kommt es zu einem steilen Abfall bis 120' p.i., der gefolgt ist von einem langsamen Abfall, so daß nach 5 Stunden in etwa - je nach Dosis - der Ausgangspunkt wieder erreicht ist.

Während das FG nach 150 µg/kg Körpergewicht Peptid A nicht wesentlich mehr ansteigt als nach 100 µg/kg Körpergewicht Peptid A, es in der "Dosiswirkungskurve" also zu einem Plateau kommt (Abb. 3), steigen die FFS bei 150 µg/kg Körpergewicht noch deutlich stärker an als nach der Gabe von 100 µg/kg Körpergewicht! In der Dosiswirkungskurve für FFS ist bei 150 µg/kg Körpergewicht noch kein Plateau zu erkennen.

Zu keinem Zeitpunkt und mit keiner von uns verwendeten Dosis konnten signifikante Veränderungen der Glucose- oder Insulinkonzentrationen erreicht werden (Tab. III und IV).

Beim Kaninchen entsprach das Verhalten von FFS und FG dem beim Miniaturschwein, wobei allerdings die Absolutwerte etwas höher lagen als beim Minipig (Tab. V und VI). Wiederum wurden die Maximalwerte nach 60' erreicht. Mit 100 µg/kg

Körpergewicht konnten zu den Zeitpunkten 10', 20' und 30' praktisch keine höheren FFS- und FG-Konzentrationen als nach der Gabe von 75 µg/kg Körpergewicht erreicht werden. Ab 60' lagen die FFS- und FG-Konzentrationen nach 100 µg/kg Körpergewicht eindeutig über denen nach Gabe von 75 µg/kg Körpergewicht.

1.2 Altersabhängigkeit der Peptid-A-Wirkung:

Wie aus Abb. 4 und 5 hervorgeht, ist die lipolytische Reaktion auf eine bestimmte Menge Peptid A/kg Körpergewicht alters- bzw. gewichtsabhängig - die lipolytische Reaktion wird mit zunehmendem Alter bzw. Gewicht stärker. Diese Reaktionsfähigkeit nimmt zwischen der 14. und 21. Woche deutlich mehr zu als zwischen der 21. Woche und der 156. Woche! Entsprechendes gilt bei Bezugnahme auf das Gewicht.

1.3 Altersabhängigkeit einiger physiologischer Parameter

Die Normalwerte von FFS und FG steigen zwischen der 14. und 21. Lebenswoche signifikant an ($p < 0,0005$ bzw. $p < 0,025$). Bei den Insulin- und Glucoseserumspiegeln besteht zwischen den beiden jungen Kollektiven kein Unterschied, während bei den ausgewachsenen Tieren mit 156 Wochen deutlich niedrigere Werte für beide Parameter zu verzeichnen sind (Tab. 8). Das lösliche Extraktprotein - als ein Bezugssystem für die folgenden Enzymuntersuchungen - zeigt die auffallendsten Veränderungen zwischen den beiden jugendlichen Kollektiven. Es sinkt zwischen der 14. und 21. Lebenswoche um mehr als 50 % ab und nimmt bis zur 156. Woche wieder etwas zu (Tab. 8).

2. In vitro Lipolyse

Das subcutane Fettgewebe des Hanford-Miniaturschweins spricht in vitro auf Dosen zwischen 10^{-4} und 10^{-1} μg Peptid A/ml Inkubationsmedium nicht an, d.h. es kommt zu keinem Anstieg der FFS und der FG im Inkubationsmedium (Tab. 7).

Erst bei Gaben von 1 - 10 μg Peptid A/ml kam es zu einem deutlichen Anstieg der FFS und der FG. Die große Streubreite der Einzelbestimmungen und die geringe Fallzahl machen es allerdings unmöglich, statistisch signifikante Unterschiede herauszuarbeiten.

3. Enzymaktivitäten

3.1 Altersabhängigkeit der Enzymaktivitäten:

Bezogen auf das Frischgewicht (Fettgewebe) nimmt im Fettgewebe die Aktivität aller von uns bestimmten Enzyme mit dem Alter deutlich ab. Signifikante Unterschiede zwischen den 14, 21 und 156 Wochen alten Tieren ($p \leq 0,01$) fanden wir bei folgenden Enzymen: G-6PDH, HK, MDH, Transaminasen (Abb. 9).

Bei Verwendung des löslichen Extraktproteins als Bezugsgrundlage kommt es zwischen der 14. und 21. Woche zu einer Enzymaktivitätssteigerung. Die niedrigsten Aktivitäten werden allerdings auch bei diesem Bezugssystem bei den 156 Wochen alten Tieren gefunden (Abb. 10). Bei allen drei Alterskollektiven ergaben sich konstante Enzymproportionen, sowohl bezogen auf Frischgewicht als auch auf Extraktprotein.

3.2 Normalwerte von Enzymaktivitäten in der Leber vom Miniaturschwein und Kaninchen

In der Leber des Miniaturschweins sind die Enzymaktivitäten des Pentosephosphatzyklus jeweils mehr

als doppelt so hoch wie die geschwindigkeitsbegrenzenden Enzyme der Glycolyse. Die höchsten Aktivitäten wurden für GDH, GPM und die Transaminasen GOT und Glu-DH gemessen. Eine Zusammenstellung der Ergebnisse bringen Tab. 10 und Abb. 11.

Die Enzymaktivitäten in der Leber von Kaninchen unterscheiden sich teilweise recht erheblich von denen des Miniaturschweins. Höhere Aktivitäten wurden bei folgenden Enzymen gemessen: G-6-PDH und 6-PGDH, HK und Glukokinase, PFK und CCE (Tab. 12 und Abb. 15). Besonders hervorgehoben soll insbesondere die deutlich aktivere Phosphofruktokinase werden, die in der Kaninchenleber dreimal so hoch ist wie in der Leber des Minipig. Nur das Malic-Enzym war in der Kaninchenleber deutlich inaktiver. Alle anderen Enzyme - GPM, PK, GDH und MDH, GK und PDE - zeigten in etwa gleiche Aktivitäten wie beim Miniaturschwein. Das lösliche Extraktprotein betrug in der Miniaturschweinleber $118,5 \pm 11,4$ und in der Kaninchenleber $109,3 \pm 9,7$.

3.3 Normalwerte von Enzymaktivitäten im subcutanen Fettgewebe des Miniaturschweins und im perirenaln Fettgewebe des Kaninchens

Wie bereits unter 3.1 beschrieben, sind beim Miniaturschwein die absoluten Enzymaktivitäten bezogen auf Frischgewicht und Extraktprotein altersabhängig (Abb. 9 und 10).

Ebenso wie beim Kaninchen (Abb. 14 und 15) lag die Aktivität der "rate-limiting"-Enzyme des EMDEN-MAYER-HOF-Cyklus - insbesondere HK - deutlich unterhalb der Aktivität des Pentose-Phosphat-Cyclus. Das Malic-Enzym war im subcutanen Fettgewebe der 21 Wochen alten Minipigs mit 929 ± 220 nU/gFGw deutlich aktiver als im perirenaln Fettgewebe des Kaninchens mit $23,5 \pm 5,1$ mU/gFGw.

Ebenso waren CCE mit 60 ± 21 und PDE mit $12,6 \pm 4,3$ im subcutanen Fettgewebe aktiver als im perirenaln Fettgewebe des Kaninchens - CCE: $23 \pm 3,9$ und PDE: $6,06 \pm 0,6$. Angegeben sind jeweils Mittelwert und Standardabweichung des Mittelwertes.

3.4 Verhalten der Enzymaktivitäten im subcutanen Fettgewebe von Hanford-Miniaturschweinen zweier Altersgruppen (16 und 156 Wochen) 60' nach i.v.-Injektion von 100 µg Pept. A/kg Körpergewicht

Wie aus Tab. 11 und Abb. 13 hervorgeht, kommt es durch Peptid A zu keiner signifikanten Änderung von Enzymaktivitäten. Der Anstieg der Mittelwerte von HK und PFK, besonders bei alten Tieren, resultiert zum wesentlichen Teil sicher aus der großen Streubreite der Einzelwerte.

3.5 Verhalten der Enzymaktivitäten im perirenaln Fettgewebe und der Leber von Kaninchen 60' nach subcutaner Injektion von 100 µg Peptid A/kg Körpergewicht

Auch im perirenaln Fettgewebe von Kaninchen konnten zum Zeitpunkt der maximalen Lipolyse durch Peptid A keine signifikanten Enzymveränderungen festgestellt werden (Abb. 14 und 15). Der scheinbare Abfall der PFK von 76,4 auf 40,4 geht auch hier auf Kosten der sehr hohen Streubreite der Einzelwerte (Tab. 12).

Auch in der Leber konnten keine signifikanten Aktivitätsveränderungen an den von uns bestimmten Enzymen durch Peptid A gefunden werden (Tab. 12).

IV. Diskussion

1. Lipolytische Aktivität von Peptid A

- 1.1 Den Ausgangspunkt unserer Untersuchungen stellten die sogenannten Langzeitkinetiken dar, bei denen die Serumparameter (FFS, FG, Glukose und Insulin) bis zu 5 Stunden nach der Injektion von Peptid A bestimmt wurden.

Die Probleme solcher über 6 Stunden laufenden Kinetiken am sich frei bewegendem Tier sind zahlreich. Zum einen muß das Tier dem mit ihm arbeitenden Menschen mit möglichst geringer Streßreaktion begegnen, um die spontane Lipolyse möglichst unbeeinflußt erfassen zu können. Daß die durch Streß bedingte Lipolyse unerheblich ist, konnte dadurch wahrscheinlich gemacht werden, daß es bei den Kontrolltieren zu keinem auffallenden Anstieg von FFS oder FG kam. Zum anderen bildete die zeitgerechte Blutentnahme ein weiteres Problem. Da manchmal der Katheter retrograd verstopft war (z.B. Anliegen des Katheters an der Herzwand oder an einer Herzklappe) mußten einzelne Werte ausgelassen werden - daraus resultieren auch die unterschiedlichen Fallzahlen. Die insgesamt doch relativ niedrigen Fallzahlen haben ihre Ursache u.a. auch in wirtschaftlichen Überlegungen. Insbesondere die Herstellung der für diese Versuche nötigen großen Mengen von hochgereinigtem Peptid A stellte eine schwere finanzielle und arbeitstechnische Belastung dar. Zudem waren die Stallungen und Operationsmöglichkeiten begrenzt.

1.2 Die lipolytische Wirksamkeit eines bestimmten lipolytisch aktiven Polypeptids scheint in vivo und in vitro u.a. von folgenden Faktoren abhängig zu sein:

- a) Vom Reinheitsgrad und Ausgangsmaterial des jeweiligen als lipolytisch postulierten Polypeptids
- b) vom Alter der verwendeten Tiere
- c) von der Spezies, der das lipolytisch wirksame Polypeptid verabreicht wird und deren Serumparame-ter als Indikator dienen.

1.2.1 Daß die Reinheitsstufe des jeweils verwendeten Lipotropins wesentlich ist, konnte SCHWANDT et al. 1972 ebenfalls am Miniaturschwein zeigen (108). Vergleicht man die damals gemessenen Werte für den Anstieg von FFS und FG nach Peptid A - Gabe mit den von mir im Rahmen der Langzeitkinetiken erhobenen Werte, so fällt auf, daß die damals gemessenen Absolutwerte deutlich über den von mir gefundenen Werten liegen. Ursache dieser Diskrepanz dürften die verschiedenen Alters- bzw. Gewichtsverteilungen sein; das Durchschnittsgewicht lag damals bei 47 kg, also um etwa 17 kg höher als die in meinen Versuchen verwendeten Tiere. Da die Tiere in den gleichen Ställen, unter gleicher Pflege und gleicher Ernährung standen, kann angenommen werden, daß die schwereren Tiere auch entsprechend älter waren.

1.2.2 Sicherlich hat das Ausgangsmaterial, insbesondere die Spezies, aus deren Organen (meist Hypophysen) das Polypeptid extrahiert wird, einen Einfluß auf die verschiedenen Eigenschaften der Substanz (siehe Übersicht 1!).

Die Wichtigkeit, biologische Wirkungen von lipolytisch aktiven Polypeptiden an verschiedenen, möglichst zahlreichen Spezies zu untersuchen, haben RUDMAN und GIROLAMO 1967 (44) betont.

1.2.3 Stellt man die am Miniaturschwein gefundenen Ergebnisse denen, an anderen Spezies (z.B. Kaninchen) erhobenen gegenüber, so ist beim Minipig die lipolytische Reaktion in vivo etwas geringer als z.B. beim Kaninchen. Dies wird auch beim Vergleich der "minimal wirksamen Dosis (MWD) deutlich: So liegt die MWD für Peptid A beim 21 Wochen alten Miniaturschwein bei ca. 25 µg/kg Körpergewicht, beim Kaninchen bei ca. 10 µg/kg Körpergewicht.

1.2.4 Die Altersangabe erscheint mir in diesem Zusammenhang - wie oben schon angedeutet - sehr wichtig, da nach Abb. 3 und 7 nicht ohne weiteres geschlossen werden kann, daß z.B. bei den 156 Wochen alten Tieren die gleiche MWD gilt.

Zahlenmäßige Angaben über die in vivo Wirkung von lipolytisch aktiven Polypeptiden am Menschen fehlen bisher in der Literatur. Lediglich FRIESEN et al. (39, 40) und TRYGSTAD et al. (126) berichten über positive Ergebnisse (ohne genauere Zahlenangaben).

Eine Zusammenstellung der wesentlichen, in der Literatur veröffentlichten Ergebnisse über die lipolytische Wirksamkeit verschiedener Polypeptide an verschiedenen Spezies. gibt folgende Übersicht, die nach SCHWANDT (104) modifiziert wurde:

2. Enzyme

2.1 Auswahl der Enzyme

Der enge Zusammenhang zwischen Fett- und KH-Stoffwechsel ist bereits in zahlreichen Arbeiten belegt (14, 31, 54, 102, 118). Beide Hauptbestandteile der Triglyceride, nämlich die Fettsäuren und das Glycerin, werden aus Kohlehydraten bzw. deren Abbauprodukten synthetisiert.

Einen der wesentlichen Verknüpfungspunkte von Fett und KH-Stoffwechsel stellt das Acetyl-Coenzym A dar. Es entsteht zum einen aus der Glycolyse, zum anderen aus dem FS-Abbau und stellt nach GIBSON et al. (43) den Grundbaustein der Freien Fettsäuren dar.

Es war deshalb naheliegend, die Schlüsselenzyme des anaeroben Glukoseabbaus wie Hexokinase, Phosphofruktokinase und Pyruvatkinase zu studieren. In der Leber übernimmt die Glukokinase den Hauptanteil der Glukosephosphorylierung und gilt als leberspezifisches "rate limiting"-Enzym der Glukoseutilisation (30). Eine weitere Verknüpfungsstelle zwischen FS-Synthese und Kohlehydratstoffwechsel stellt das reduzierte Nucleotid NADPH dar. Es wird nach Berechnungen von FLATT und BALL (37) und nach KATZER et al. (60) zu 60 % aus den einleitenden Reaktionen des Pentosephosphatshunts (Enzyme: Glukose-6-Phosphat-Dehydrogenase und 6-Phosphogluconat-Dehydrogenase) gewonnen. Bei diesen Reaktionen werden neben Kohlendioxid und Pentose zwei Moleküle NADPH gebildet.

Eine weitere Möglichkeit der NADPH-Bildung stellt die oxydative Decarboxylierung von Malat und Pyruvat durch das ME dar. Diese Reaktion ist ein Teil des von ROGNSTAD und KATZ (97) beschriebenen Pyruvatcyclus der als Nettoerfolg den

Transport von Acetat durch die Mitochondrienmembran und die Übertragung von reduzierendem Wasserstoff von NADH auf NADP hat. Eine weitere, ebenfalls extramitochondriale Reaktion dieses Cyclus wird durch das Citrat-Cleavage-Enzym katalysiert, dessen Aktivität nach den Angaben von SHRANGO (114) et al. als Indikator für die lipogenetische Aktivität des Gewebes angesehen werden kann.

Eine dritte Möglichkeit der NADPH-Gewinnung findet sich bei der Desaminierung der Glutaminsäure zu Ketoglutarsäure mit Hilfe der Glutamatdehydrogenase, welche im Gegensatz zur Glutamat-Oxalacetat-Transaminase (ein anderer Abbauweg der Glutaminsäure) den Wasserstoff sowohl auf NAD als auch auf NADP übertragen kann (87).

Da im Fettgewebe von Schwein und Kaninchen keine Glycerokinase nachweisbar ist (33), muß das zur Veresterung von FFS nötige Glycerophosphat ebenfalls aus Glukose neu synthetisiert werden. In der Leber des Kaninchens und des Miniaturschweins ist zwar eine Glycerokinaseaktivität meßbar (Tab. 10 und 12); die Aktivität ist aber relativ gering, so daß der Großteil des Glycerophosphats auch in der Leber (Tab. 10 und 12) über die Glycolyse aufgebaut werden dürfte. Dazu wird das Dihydroxyacetonphosphat - ein Endprodukt der Aldolasereaktion - mit Hilfe des Enzyms Glycerin-1-Phosphat-Dehydrokinase (GDH) zu Glycerophosphat reduziert (16). Diese Reaktion läuft im Zytoplasma ab und ist somit in kombinierten Enzymtests relativ leicht zu bestimmen. Die Rückreaktion mit Hilfe der Glycerin-1-Phosphat-Oxydase läuft intramitochondrial ab. Mit Hilfe der Aktivitätsmessung

der GDH soll damit die Bereitstellung des Glycerophosphats kontrolliert werden. Um eine genauere Aussage über die Neusynthese von Glycerophosphat machen zu können, müßten allerdings zusätzlich die Aktivität der Glyzerin-1-Phosphat-Oxydase und die Gewebespiegel des Glycerophosphats gemessen werden. Beide Bestimmungen waren aber im Rahmen der aufwendigen Enzymmuster technisch zu umständlich.

2.2 Altersabhängigkeit der Enzymmuster

Da die lipolytische Aktivität von Peptid A bei verschieden alten Tieren deutliche Unterschiede zeigte, haben wir an den drei Alterskollektiven Enzymaktivitätsmuster des subcutanen Fettgewebes bestimmt. Obwohl eine große Anzahl von Untersuchungen von altersabhängigen Enzymveränderungen am Schwein existieren, ist ein Vergleich mit meinen Ergebnissen nur schwer möglich. Insbesondere haben die meisten Autoren (1, 3, 8, 68, 123) nur verschiedene Lebensabschnitte kurz nach der Geburt untersucht. Die ältesten Versuchsgruppen in der Literatur waren darum zwischen 30 und 40 Wochen alt, - entsprechen also in etwa dem mittleren Kollektiv der vorliegenden Arbeit.

Es ist bekannt, daß die Lipogenese im Fett- und Lebergewebe der Ratte sofort nach der Geburt gebremst wird, während der Trinkperiode deutlich ansteigt, um dann bis zum Erwachsenenalter wieder langsam zurückzugehen (54). ALLEE et al. (1) zeigten am subcutanen Fettgewebe der Schweine, daß die Lipogenese bzw. der ^{14}C -Einbau aus $\text{U-}^{14}\text{C}$ -Glukose bei 35 Tage alten Schweinen am geringsten ist, bis zum 70. Tag steil ansteigt,

um dann bis zum 180. Tag wieder exponentiell abzufallen. Die gleichzeitig gemessenen Aktivitäten von CCE und ME erreichen ihre Maximalwerte zwischen dem 87. und 109. Tag. ANDERSON und KAUFMANN (3) fanden ähnliche altersabhängige Enzymaktivitätsveränderungen im subcutanen Fettgewebe von Schweinen. Die maximalen Aktivitäten für G-6-PDH, 6-PGDH, ME und CCE wurden einheitlich nach 5 Monaten erreicht, wenn als Bezugsgröße die Fettzellzahl, das lösliche Extraktprotein oder das Gewicht der Tiere gewählt wurde. Bezogen auf Gramm Frischgewicht fanden sich die höchsten Enzymaktivitäten bereits nach zwei Monaten.

Unsere Ergebnisse stimmen im wesentlichen mit diesen Angaben aus der Literatur überein. So fanden wir bei den 14 Wochen alten Tieren die höchsten Enzymaktivitäten, die bei der Bezugsgröße Organfrischgewicht bei den älteren Tieren deutlich abnahmen. Bezogen auf Extraktprotein kam es zwischen den 14 und 21 Wochen alten Tieren zu einem deutlichen Anstieg der Aktivität, so daß die 21 Wochen alten Tiere die höchsten Enzymaktivitäten zeigten. Für die Enzyme des Emden-Meyerhof-Cyclus, Transaminasen und PDE fanden wir keine altersbezogenen Vergleichsgrößen in der Literatur. Auch für die Enzymmuster bei den fast 3 Jahre alten Tieren fanden wir keine vergleichbaren Werte in den Arbeiten anderer Autoren.

2.3 Einfluß des lipolytisch aktiven Polypeptids auf verschiedene Enzyme

2.3.1 Lipolytisch aktive Polypeptide und Enzyme

Bereits 1968 haben SCHWANDT et al.(105)

Autor (Lit.)	Substanz (von Spezies)	Versuchstier			Ente	Ratte	Hund	Mensch
		Schwein	Kaninchen					
Schwandt et al (103,109)	Peptid A (Schwein)	23 µg/kg	10 µg/kg		10 µg/kg			
Rudman et al (98)	Fr. H (Schwein)		ca. 10 µg/kg					
Tomasi et al (121)	beta-LPH (Schwein)	+	3 µg/kg			Ø	Ø	
Graf et al (47)	gamma-LPH (Schwein)		+					
Friesen et al (40)	Peptid I (Schwein)		ca. 10 µg/kg				Ø (I + II) (I + II)	+
Trygstad et al (126)	IMF (Mensch)		10 µg/kg					+
Cseh g. et al (25)	beta-LMF (Mensch)		10 µg/kg					
Lohmar et al (75)	beta-LPH (Schaf)		10 µg/kg					

Übersicht 1: Zusammenstellung der in vivo-Untersuchungen über lipolytisch aktive Polypeptide an verschiedenen Spezies.

Autor	Substanz (von Spezies)	Versuchstier		Kaninchen	Ente	Ratte	Meerschwein	Mensch
		Schwein						
Schwandt (109, 110)	Pept. A (Schwein)	Ø		0,008	1,0	0,01	1,0	10,0
Schwandt (109, 110)	Pept. B (Schwein)			0,06		2,3	2,63	
Cseh u. Graf (25)	beta-LPH (Schwein)	0,005		0,005		20,0		3,0
Rudman (98, 99)	Fr. H (Schwein)	Ø		0,03		Ø	100,0	Ø
Graf (46, 47)	gamma-LPH (Schwein)			0,01		Ø		
Rudman (93, 94)	7 D 7 (Schwein)			0,01				
Rudman (94)	7 D 6 (Schwein)			0,1		Ø	10,0	
Friesen (40)	Pept. I (Schwein)			0,01		Ø		
Chretien (20)	gamma-LPH (Schaf)			0,01		Ø		
Trygstad (126)	LMF / (Mensch)			0,000 001		Ø		0,001
Lohmar (76)	beta-LPH (Rind)			0,094				

Übersicht 2: Zusammenstellung der in vitro-Untersuchungen über lipolytisch aktive Polypeptide an verschiedenen Spezies

mit Fraktion H (Vorstufe von Fraktion J) eine signifikante Hemmung der Enzyme Glukose-6-Phosphatdehydrogenase, Glycerophosphat-Dehydrogenase und Malatdehydrogenase im Fettgewebe von Kaninchen festgestellt. Diese Befunde sprachen dafür, daß durch die lipolytisch aktive Fraktion es zu einer Herabsetzung der Glycerophosphat-Bereitstellung und damit zu einer Verminderung der Reveresterungsrate von FFS kommt und das für die FFS-Synthese nötige NADPH aus dem Pentosephosphatcyclus in geringerem Maße zur Verfügung steht.

In vitro führte Fraktion J (Vorstufe von Peptid A) zu einer signifikanten Hemmung der Phosphodiesterase-Aktivität (106). Dies würde zu einem Anstieg des 3'5'-AMP-Spiegels und somit über eine Aktivierung der Lipase zu einer gesteigerten Lipolyse führen. Allerdings müßten zur endgültigen Abklärung sowohl 3'5'-AMP-Spiegel als auch die Aktivität der Adenylcyclase bekannt sein.

In vivo konnten durch Peptid A weder im subcutanen Fettgewebe des Hanford-Miniaturschweins noch im perirenenalen Fettgewebe und Lebergewebe des Kaninchens signifikante Enzymveränderungen festgestellt werden. Letzteres stimmt mit den Ergebnissen überein, die SCHWANDT et al. (112) mit Fraktion H an der Kaninchenleber durchgeführt haben.

Unklar bleibt, wieso es trotz der extrem hohen Serumspiegel von FFS zu keinerlei Veränderungen der Leberenzyme kommt. Ob sich hier möglicherweise die Wirkungen der FFS und des Peptid A aufheben, muß offen bleiben (85).

Obwohl diese Ergebnisse eher gegen eine Veränderung der Glycerophosphatbereitstellung sprechen, müssen in weiteren Untersuchungen die Gewebsspiegel dieses für die Triglyceridsynthese wichtigen Substrats direkt bestimmt werden.

Insgesamt sprechen diese Befunde für eine direkte Beeinflussung der Triglyceridlipase bzw. der Adenylcyclase, die dann über 3'5'-AMP-Spiegel zu einer gesteigerten Lipolyse führt.

Wenn durch die vorliegenden Ergebnisse eine direkte Beziehung zwischen Peptid A und den untersuchten Enzymen eher unwahrscheinlich ist, so soll nicht verschwiegen werden, daß durch die Versuchsbedingungen, insbesondere die Zeitwahl, solche Einflüsse evtl. nicht erkannt wurden.

V. Zusammenfassung

Die lipolytische Aktivität des von SCHWANDT et al. isolierten Peptid A kann als gesichert angesehen werden. In der vorliegenden Arbeit stellten sich nun die Fragen, welcher zeitliche Ablauf dieser lipolytischen Reaktion zu Grunde liegt, welche Dosiswirkungskurve für Peptid A gilt und inwieweit Peptid A direkt über eine Hemmung oder Aktivierung bestimmter Enzyme aus dem Fett- oder Kohlehydratmetabolismus wirkt.

Bei Miniaturschweinen verschiedener Altersgruppen und bei Kaninchen wurden in vivo die lipolytische Aktivität von Peptid A über mehrere Stunden anhand von freien Fettsäure- und freien Glycerinspiegeln gemessen. Es zeigte sich, daß die maximale lipolytische Aktivität dosisunabhängig nach etwa 60' nachweisbar ist. Mit 100 µg Peptid A/kg Körpergewicht konnte bei allen Tieren ein deutlicher lipolytischer Effekt erzielt werden.

Als nächstes wurde geprüft, inwieweit das Alter der Tiere einen Einfluß auf die lipolytische Wirksamkeit von Peptid A hat. So wurden an drei Altersgruppen von Miniaturschweinen die lipolytische Aktivität von 100 µg Peptid A/kg Körpergewicht 60' nach Injektion gemessen. Dabei zeigte sich, daß die lipolytische Aktivität von Peptid A altersabhängig ist; mit zunehmendem Alter der Versuchstiere kam es zu signifikant höheren Anstiegen der freien Fettsäuren und des freien Glycerins nach Peptid A-Gabe.

Vor der Untersuchung auf Enzymveränderungen durch Peptid A wurde überprüft, inwieweit die Enzymaktivität im Fettgewebe vom Alter der Tiere abhängt. Es zeigte sich, daß bei den drei Jahre alten Tieren

unabhängig vom Bezugssystem die niedrigsten Enzymaktivitäten nachweisbar waren. Bei den jüngeren Miniaturschweinen - 14 und 22 Wochen alte Tiere - war das Bezugssystem von besonderer Bedeutung. Bezogen auf das Organfrischgewicht zeigten sich bei den 14 Wochen alten Tieren die höchsten Enzymaktivitäten, während, bezogen auf lösliches Extraktprotein, die maximalen Enzymaktivitäten bei den 22 Wochen alten Tieren gefunden wurden.

Um mögliche weitere Effekte auf den Intermediärstoffwechsel der Erfolgsorgane zu prüfen, wurden folgende Enzymaktivitäten untersucht:

G-6-PDH, 6-PGDH, GPM, HK, PK, PFK, GDH, MDH, GPT, GOT und Glu-DH.

Dazu wurden den 14 und 156 Wochen alten Tieren 100 µg Peptid A/kg Körpergewicht verabreicht und nach 60' die Enzymaktivitäten im subkutanen Fettgewebe gemessen. Es konnten bei keinem der untersuchten Enzyme signifikante Aktivitätsveränderungen festgestellt werden.

Ausgehend von der gleichen Fragestellung wurden zwei Gruppen von Kaninchen ebenfalls 100 µg Peptid A/kg Körpergewicht injiziert und 60' nach dieser Gabe die Enzymaktivitäten im Fett- und Lebergewebe bestimmt. Auch bei diesen Untersuchungen kam es zu keinen signifikanten Enzymaktivitätsveränderungen.

Die im Fett- und Lebergewebe bei den beiden Spezies gefundenen Enzymnormalwerte stimmten mit den in der Literatur angegebenen Werten überein.

LEGENDEN DER ABKÜRZUNGEN

CCE	Citrate Cleavage Enzyme
FFS	Freie Fettsäure
FG	Freies Glycerin
GDH	Glycerin-1-Phosphatdehydrogenase
GK	Glycerokinase
Glucokinase	Glucokinase
G-6-PDH	Glucose-6-Phosphatdehydrogenase
Glu-DH	Glutamatdehydrogenase
GOT	Glutamatoxalacetattransaminase
GPM	Glucophosphomutase
GPT	Glutamatpyruvattransaminase
HK	Hexokinase
MDH	Malatdehydrogenase
ME	Malic Enzyme
PDE	Phosphodiesterase
PFK	Phosphofruktokinase
PK	Pyruvatkinase
6-PGDH	6-Phosphogluconatdehydrogenase

VI. Zusammenstellung der Tabellen

Tabelle
Nr.

- | | |
|----|--|
| 1 | FFS-Spiegel im Serum des Minipigs nach Pept.A-Gabe |
| 2 | FG-Spiegel im Serum des Minipigs nach Pept.A-Gabe |
| 3 | Glukose-Spiegel im Serum des Minipigs nach Pept.A-Gabe |
| 4 | Insulin-Spiegel im Serum des Minipigs nach Pept.A-Gabe |
| 5 | FFS-Spiegel im Serum des Kaninchens nach Pept.A-Gabe |
| 6 | FG-Spiegel im Serum des Kaninchens nach Pept.A-Gabe |
| 7 | In-vitro-Lipolyse beim Schwein |
| 8 | Serum-Normalwerte dreier Alterskollektive (Minipig) |
| 9 | Enzym-Normalwerte dreier Alterskollektive (Minipig) |
| 10 | Enzymnormalwerte in der Leber des Minipigs |
| 11 | Enzymaktivitäten im Fettgewebe des Minipigs vor
und nach Pept.A-Gabe |
| 12 | Enzymaktivität im Fett- und Lebergewebe des
Kaninchens vor und nach Pept.A-Gabe |

Freie Fettsäuren. (m Val/l)

	Nü ⁺	nach 10'	20'	30'	60'	90'	120'	180'	240'	300'
25 $\bar{x}$ $\mu\text{g/kg (n)}$ $s_{\bar{x}}$	0,32 (3) 0,017	0,31 (2) n.b.	0,34 (3) 0,025	0,34 (3) 0,031	0,34 (3) 0,025	0,34 (3) 0,025				
50 $\bar{x}$ $\mu\text{g/kg (n)}$ $s_{\bar{x}}$	0,34 (4) 0,02	0,41 (4) 0,06	0,60 (4) 0,13	0,79 (4) 0,20	1,00 (4) 0,27	0,81 (4) 0,16	0,58 (3) 0,10	0,47 (4) 0,08	0,46 (4) 0,09	0,46 (4) 0,09
75 $\bar{x}$ $\mu\text{g/kg (n)}$ $s_{\bar{x}}$	0,30 (3) 0,01	0,45 (3) 0,09	0,97 (3) 0,12	1,17 (3) 0,34	1,47 (3) 0,37	1,26 (3) 0,33	0,90 (3) 0,28	0,43 (3) 0,08	0,46 (3) 0,03	0,41 (3) 0,06
100 $\bar{x}$ $\mu\text{g/kg (n)}$ $s_{\bar{x}}$	0,30 (5) 0,03	0,66 (5) 0,06	1,03 (4) 0,14	1,52 (5) 0,23	1,76 (5) 0,30	1,75 (5) 0,32	1,06 (5) 0,23	0,53 (5) 0,07	0,37 (5) 0,02	0,32 (5) 0,02
150 $\bar{x}$ $\mu\text{g/kg (n)}$ $s_{\bar{x}}$	0,35 (4) 0,01	0,64 (4) 0,06	1,28 (4) 0,24	1,70 (4) 0,27	2,23 (4) 0,25	2,29 (4) 0,22	1,71 (4) 0,25	1,04 (4) 0,18	0,48 (4) 0,04	0,35 (4) 0,02

Nü⁺ = vor Injektion des Peptid A.

Tabelle 1: Serumkonzentrationen der Freien Fettsäuren (in m Val/l) vor und nach verschiedenen Zeitpunkten nach Injektion unterschiedlicher Mengen Peptid A/kg Körpergewicht (Miniaturschwein).
n.b. = wurde nicht bestimmt.

		Freies Glycerin (m Mol/l)							
	Vor Pept. A.	nach 10'							
			20'	30'	60'	90'	120'	180'	
25 µg/kg (n) s $\bar{x}$	0,024 (3) 0,0	0,031 (2) 0,008	0,032 (3) 0,007	0,028 (3) 0,009	0,035 (3) 0,008	0,027 (3) 0,008			300'
50 µg/kg (n) s $\bar{x}$	0,020 (4) 0,004	0,072 (4) 0,020	0,120 (4) 0,028	0,144 (4) 0,025	0,135 (4) 0,024	0,079 (4) 0,013	0,057 (4) 0,016	0,042 (4) 0,007	0,047 (4) 0,013
75 µg/kg (n) s $\bar{x}$	0,029 (3) 0,008	0,083 (3) 0,027	0,195 (3) 0,029	0,198 (3) 0,039	0,213 (3) 0,041	0,116 (3) 0,014	0,111 (3) 0,020	0,037 (3) 0,001	0,048 (3) 0,014
100 µg/kg (n) s $\bar{x}$	0,021 (5) 0,003	0,167 (5) 0,026	0,264 (4) 0,026	0,339 (5) 0,037	0,345 (5) 0,050	0,280 (5) 0,026	0,139 (5) 0,019	0,074 (5) 0,018	0,030 (5) 0,006
150 µg/kg (n) s $\bar{x}$	0,023 (4) 0,003	0,118 (4) 0,015	0,272 (4) 0,059	0,322 (4) 0,054	0,347 (4) 0,046	0,260 (4) 0,025	0,137 (4) 0,016	0,089 (4) 0,027	0,043 (4) 0,006

Tabelle 2: Serumkonzentrationen des Freien Glycerins (in m Mol/l) vor und zu verschiedenen Zeitpunkten nach Injektion unterschiedlicher Mengen Peptid A/kg Körpergewicht (Miniaturschwein)
n.b.= wurde nicht bestimmt.

Glucose (mg/100 ml)

Vor
Pept. A. nach
10'

	20'	30'	60'	90'	120'	180'	240'	300'
25 $\bar{x}$	83,7	89,7	119,3					
$\mu\text{g/kg (n)}$	(3)	(2)	(3)					
$s_{\bar{x}}$	11,3	12,4	7,1					
50 $\bar{x}$	92,3	93,3	89,0	105,3	99,0	87,5	88,5	94,5
$\mu\text{g/kg (n)}$	(4)	(4)	(4)	(4)	(3)	(4)	(4)	(4)
$s_{\bar{x}}$	8,6	11,2	4,3	8,6	15,1	9,1	7,5	10,0
75 $\bar{x}$	93,7	100,7	96,7	104,3	91,0	87,3	92,7	95,0
$\mu\text{g/kg (n)}$	(3)	(3)	(3)	(3)	(3)	(3)	(3)	(3)
$s_{\bar{x}}$	13,4	10,1	12,4	7,1	14,2	8,9	5,4	8,4
100 $\bar{x}$	88,0	95,0	88,8	85,8	101,4	86,8	80,6	80,0
$\mu\text{g/kg (n)}$	(5)	(4)	(4)	(5)	(5)	(5)	(5)	(5)
$s_{\bar{x}}$	11,3	6,5	9,7	8,5	14,8	10,3	5,2	6,1
150 $\bar{x}$	81,0	86,8	83,0	74,5	83,5	78,5	89,5	83,3
$\mu\text{g/kg (n)}$	(4)	(4)	(4)	(4)	(4)	(4)	(4)	(4)
$s_{\bar{x}}$	3,9	2,5	2,3	4,2	3,9	4,8	9,4	5,4

Tabelle 3: Serumkonzentrationen der Glucose (in mg/100 ml) vor und zu verschiedenen Zeitpunkten nach Injektion unterschiedlicher Mengen Peptid A/kg Körpergewicht (Miniaturschwein)
n.b. = wurde nicht bestimmt.

Insulin (uE/ml)

Vor		nach		Insulin (uE/ml)							
Pept. A.		10'		20'	30'	60'	90'	120'	180'	240'	300'
25	$\bar{x}$	19,0	25,0	28,7	29,3	22,0	20,7	19,7			
	$\mu\text{g/kg (n)}$	(3)	(2)	(3)	(3)	(3)	(3)	(3)			
	$s_{\bar{x}}$	2,1	4,0	4,9	6,2	4,0	5,8	1,9			
50	$\bar{x}$	22,5	17,8	18,5	19,3	21,3	25,3	19,6	24,3	18,8	18,8
	$\mu\text{g/kg (n)}$	(4)	(4)	(4)	(4)	(4)	(4)	(3)	(4)	(4)	(4)
	$s_{\bar{x}}$	3,4	1,6	2,5	1,8	3,4	3,2	3,0	7,0	4,5	5,2
75	$\bar{x}$	17,3	15,0	26,0	24,3	21,7	20,3	19,3	18,0	14,4	17,3
	$\mu\text{g/kg (n)}$	(3)	(3)	(3)	(3)	(3)	(3)	(3)	(3)	(3)	(3)
	$s_{\bar{x}}$	4,9	2,1	8,1	5,6	2,9	3,5	3,0	4,2	2,9	5,6
100	$\bar{x}$	20,8	21,2	29,3	25,4	24,2	26,4	25,2	20,0	27,2	21,4
	$\mu\text{g/kg (n)}$	(5)	(5)	(3)	(5)	(5)	(5)	(5)	(5)	(5)	(5)
	$s_{\bar{x}}$	1,5	2,2	3,5	3,2	2,9	2,8	2,1	3,4	3,7	1,7
150	$\bar{x}$	18,0	23,0	25,0	22,5	21,5	22,3	24,5	22,3	20,0	18,8
	$\mu\text{g/kg (n)}$	(4)	(4)	(4)	(4)	(4)	(4)	(4)	(3)	(3)	(4)
	$s_{\bar{x}}$	1,6	2,5	4,1	3,2	2,9	2,3	3,4	5,0	5,2	2,0

Tabelle 4: Serumkonzentrationen des Insulins (in uE/ml) vor und zu verschiedenen Zeitpunkten nach Injektion unterschiedlicher Mengen Peptid A/kg Körpergewicht (Miniaturschwein)
n.b. = wurde nicht bestimmt.

Freie Fettsäuren (m Val/l)

	Vor Pept. A.	nach 10 min	20'	30'	60'	90'	120'	180'	240'	300'
25 $\bar{x}$ $\mu\text{g/kg (n)}$ s_x	0,35 (5) 0,02	0,38 (4) 0,05	0,42 (4) 0,06	0,44 (4) 0,05	0,46 (5) 0,08	0,49 (5) 0,10	0,46 (5) 0,08	0,40 (5) 0,05	0,38 (5) 0,05	0,44 (5) 0,08
50 $\bar{x}$ $\mu\text{g/kg (n)}$ s_x	0,36 (6) 0,02	0,48 (6) 0,07	0,73 (6) 0,15	1,00 (6) 0,24	1,31 (6) 0,29	1,29 (6) 0,34	1,06 (5) 0,32	0,66 (6) 0,14	0,53 (6) 0,07	0,53 (6) 0,08
75 $\bar{x}$ $\mu\text{g/kg (n)}$ s_x	0,37 (5) 0,04	0,64 (5) 0,13	1,18 (5) 0,16	1,55 (5) 0,30	1,96 (5) 0,36	1,85 (5) 0,41	1,56 (5) 0,43	0,73 (5) 0,18	0,64 (5) 0,12	0,58 (5) 0,11
100 $\bar{x}$ $\mu\text{g/kg (n)}$ s_x	0,39 (6) 0,04	0,75 (6) 0,04	1,65 (6) 0,17	2,01 (6) 0,16	2,87 (6) 0,22	2,51 (6) 0,10	1,99 (6) 0,14	1,37 (6) 0,16	0,90 (6) 0,06	0,54 (6) 0,08
150 $\bar{x}$ $\mu\text{g/kg (n)}$ s_x										

Tabelle 5: Serumkonzentrationen der Freien Fettsäuren (in m Val/l) vor und zu verschiedenen Zeitpunkten nach Injektion unterschiedlicher Mengen Peptid A/kg Körpergewicht (Kaninchen)

Freies Glycerin (m Mol/l)

Vor Pept. A.		nach 10'	20'	30'	60'	90'	120'	180'	240'	300'
25 µg/kg (n) s $\bar{x}$	$\bar{x}$	0,027	0,032	0,039	0,040	0,051	0,046	0,036	0,036	0,035
	(n)	(5)	(4)	(5)	(4)	(5)	(5)	(5)	(5)	(5)
	s $\bar{x}$	0,006	0,009	0,007	0,013	0,011	0,013	0,007	0,009	0,007
50 µg/kg (n) s $\bar{x}$	$\bar{x}$	0,022	0,076	0,131	0,154	0,164	0,115	0,069	0,058	0,052
	(n)	(6)	(6)	(6)	(6)	(6)	(6)	(6)	(6)	(6)
	s $\bar{x}$	0,003	0,015	0,026	0,027	0,028	0,029	0,011	0,005	0,009
75 µg/kg (n) s $\bar{x}$	$\bar{x}$	0,038	0,127	0,221	0,247	0,262	0,185	0,135	0,062	0,062
	(n)	(5)	(5)	(5)	(5)	(5)	(5)	(5)	(5)	(5)
	s $\bar{x}$	0,007	0,031	0,024	0,036	0,039	0,031	0,020	0,007	0,012
100 µg/kg (n) s $\bar{x}$	$\bar{x}$	0,047	0,134	0,221	0,250	0,295	0,251	0,117	0,102	0,076
	(n)	(6)	(6)	(6)	(6)	(6)	(6)	(6)	(6)	(6)
	s $\bar{x}$	0,015	0,016	0,020	0,018	0,014	0,019	0,022	0,011	0,012
150 µg/kg (n) s $\bar{x}$	$\bar{x}$									
	(n)									
	s $\bar{x}$									

Tabelle 6: Serumkonzentrationen des Freien Glycerins (in m Mol/l) vor und zu verschiedenen Zeitpunkten nach Injektion unterschiedlicher Mengen Peptid A/kg Körpergewicht (Kaninchen)

In vitro	(n)	$\bar{x}$	$s_{\bar{x}}$
100 mg Fettgewebe + 3 ml gew. Albuminpuffer	4	0,0825	0,0187
+ 0,001 µg Pept. A	4	0,0800	0,0187
+ 0,1 µg Pept. A	4	0,0650	0,0132
+ 0,1 µg Pept. A	4	0,0725	0,0200
+ 1,0 µg Pept. A	4	0,2150	0,1010
+ 10,0 µg Pept. A	4	0,3550	0,1800
+ IE ACTH	4	0,3450	0,0870
+ IE ACTH	4	0,3375	0,0939

Tabelle 7a: In vitro Lipolyse beim Miniaturschwein.
Angabe ist die Freisetzung von Fettsäure
in µ Mol/100 mg Fettgewebe in 3 Std.

In vitro	(n)	$\bar{x}$	$s_{\bar{x}}$
100 mg Fettgewebe + 3 ml gew. Albuminpuffer	4	0,0421	0,0141
+ 0,001 µg Pept. A	4	0,0347	0,0086
+ 0,01 µg Pept. A	4	0,0457	0,0100
+ 0,1 µg Pept. A	4	0,0490	0,0086
+ 1,0 µg Pept. A	4	0,1000	0,0367
+ 10,0 µg Pept. A	4	0,1875	0,0606
+ IE ACTH	4	0,1375	0,0460
+ IE ACTH	4	0,1390	0,0611

Tabelle 7b: In vitro Lipolyse beim Miniaturschwein.
Angabe ist die Freisetzung von freiem Glycerin (FG)
in µ Mol/100 mg in 3 Std.

Alter	14 Wochen (n = 5)	21 Wochen (n = 9)	2 Jahre (n = 5)
Gewicht kg ($\bar{x} \pm s_x$)	22,9 $\pm$ 1,5	31,0 $\pm$ 1,1	84,6 $\pm$ 5,8
FFS m Vol/l ($\bar{x} \pm s_x$)	0,33 $\pm$ 0,02	0,52 $\pm$ 0,10	0,43 $\pm$ 0,16
FG Mol/l ($\bar{x} \pm s_x$)	0,039 $\pm$ 0,003	0,098 $\pm$ 0,057	0,052 $\pm$ 0,014
Insulin uE/ml ($\bar{x} \pm s_x$)	18,5 $\pm$ 4,4 (n = 4)	20,8 $\pm$ 1,5 (n = 5)	13,7 $\pm$ 1,4 (n = 4)
Glucose mg % ($\bar{x} \pm s_x$)	88 $\pm$ 15	88 $\pm$ 11,3	51 $\pm$ 10
Extraktprotein mg/gFG ($\bar{x} \pm s_x$)	15,75 $\pm$ 3,24	7,56 $\pm$ 1,56	8,37 $\pm$ 2,33

60 Minuten nach Pept. A wurden bei den selben Tieren folgende Werte gefunden:

FFS	0,76 $\pm$ 0,04	1,78 $\pm$ 0,77	2,71 $\pm$ 0,31
FG	0,173 $\pm$ 0,0101	0,324 $\pm$ 0,048	0,423 $\pm$ 0,0101
Insulin	21,8 $\pm$ 2,5 (n = 4)	24,2 $\pm$ 6,4 (n = 5)	18,0 $\pm$ 3,8 (n = 4)
Glucose	103 $\pm$ 19	85,6 $\pm$ 9,9	44 $\pm$ 5

Tabelle 8: Normalwerte dreier Alterskollektive und die FFS, FG, Glucose- und Insulinwerte 60 Minuten nach Injektion von 100 µg Pept. A via Katheter

Enzyme	14 Wochen (n = 5)			21 Wochen (n = 5)			156 Wochen (n = 5)		
G-6-PDH	978 70,5	± 285 ± 50,2	(127) (22,6)	365 118	± 299 ± 67,5	(99) (22,5)	210 24	± 160 ± 13	(71) (5,7)
G PgdH	514 35	± 46 ± 18	(21) (8,1)	425 79	± 78 ± 52	(26) (17,5)	194 24	± 83 ± 12	(39) (5,3)
G PM	8824 418	± 9314 ± 273	(4166) (122)	4955 599	± 7504 ± 699	(2501) (233)	1288 140	± 950 ± 35	(425) (16)
HK	111 7,5	± 8,2 ± 3,5	(4) (1,6)	70 12,1	± 21,7 ± 6,4	(7,0) (2,1)	5,3	± 1,7	(0,8)
PK	24227 1167	± 24028 ± 775	(17042) (346)	8839 1154	± 9335 ± 859	(3244) (298)	1666 184	± 1310 ± 70	(586) (52)
PFK	1173 52	± 1402 ± 54	(627) (24,2)	738 88	± 1032 ± 100	(227) (33)	22,6 2,3	± 21,6 ± 1,3	(10,5) (0,6)
GDH	5609 297	± 4213 ± 106	(1884) (48)	3907 615	± 3397 ± 552	(1192) (181)	890 117	± 217 ± 52	(97) (23)
MDH	55644 3767	± 8387 ± 1866	(3975) (835)	24266 4328	± 6377 ± 2599	(2126) (866)	15692 1909	± 8086 ± 847	(3616) (379)
GPT	307 20,8	± 48 ± 10,2	(22) (4,6)	231 40,3	± 85 ± 24	(28) (8)	141 21,9	± 28,5 ± 17,9	(13) (7,9)
GOT	1387 101	± 586 ± 65	(262) (29)	820 143	± 272 ± 79	(91) (26)	357 51	± 74 ± 28	(33) (12,3)
Glu-DH	132 9,2	± 26 ± 5,4	(11) (2,4)	82 14,8	± 23 ± 10,5	(8) (3,5)	64 8,9	± 16,4 ± 5,8	(7,3) (2,6)

Tabelle 9: Enzymaktivitäten im Fettgewebe von Miniaturschweinen verschiedenen Alters.

Angegeben sind jeweils $\bar{x} \pm s_x$ (s_x^2); obere Zeile jeweils in mU/gFgew. und untere Zeile in mU/mg EP

Enzyme	mU/g FGw (n = 9)				mU/mg EP (n = 9)			
G-6-PDH	1327	±	345	(115)	11,9	±	4,2	(1,4)
6-PGDH	1339	±	457	(152)	11,7	±	3,5	(1,2)
GPM	81057	±	56178	(16726)	752	±	495	(165)
HK	101	±	12	(4)	0,95	±	0,34	(0,11)
Glukokinase	674	±	235	(78)	6,3	±	3,1	(1,0)
PFK	577	±	224	(74)	5,7	±	1,47	(0,52)
PK	8983	±	1799	(600)	81	±	26,6	(8,9)
GDH	38818	±	2322	(879)	353	±	88	(30)
MDH	151756	±	16405	(5000)	1458	±	245	(87)
ME	309	±	140	(46)	2,84	±	1,71	(0,57)
CCE n = 5	80,8	±	17,6	(7,9)	0,72	±	0,32	(0,11)
GK	590	±	101	(68)	5,39	±	2,18	(0,8)
PDE	132	±	42	(14)	0,99	±	0,14	(0,05)
Glu-DH	19124	±	4197	(1400)	169	±	39	(13)
GPT	4396	±	773	(273)	38,9	±	9,6	(3,4)
GOT	57971	±	12249	(4083)	486	±	187	(63)

Tabelle 10: Enzymaktivitäten in der Leber von 21 Wochen alten Hanford-Miniaturschweinen. Angegeben sind die Mittelwerte ± Standardabweichung (Standardabweichung des Mittelwerts); mit Ausnahme des CCE (n = 5) wurden jeweils 9 Tiere untersucht.

I. Gruppe: 14 Wochen alt (n = 5)

Enzyme	Kontrolle		60'nach 100 µg Pept. A		Kontrolle		60' nach 100 µg Pept. A		
G-6-PDH	978 71	± 285 ± 51	± 154 ± 47	(69) (21)	210 24,3	± 160 ± 12,8	283 23,7	± 112 ± 11,5	(50) (5,2)
6-P-GDH	514 35	± 46 ± 18,1	± 74 ± 4,0	(33) (1,3)	194 24	± 88 ± 12	242 20	± 69 ± 8,1	(31) (3,6)
GPM	8824 418	± 9314 ± 273	± 8820 ± 317	(39,45) (1,42)	1288 140	± 950 ± 35	3015 153	± 1639 ± 96	(733) (43)
HK	111 7,5	± 8 ± 3,5	± 27 ± 0,9	(12) (0,4)	47,4 5,3	± 29,0 ± 1,7	57,8 4,9	± 18,2 ± 2,6	(8,1) (1,1)
PK	24227 1167	± 24018 ± 775	± 22011 ± 793	(9344) (354)	1666 184	± 1310 ± 70	3094 219	± 2624 ± 136	(1173) (61)
PFK	1173 52	± 1402 ± 54	± 1149 ± 42	(514) (16)	22,6 2,3	± 21,6 ± 1,3	112,6 11,6	± 104,1 ± 10,8	(41,3) (4,2)
GDH	5609 279	± 4214 ± 106	± 2410 ± 82	(1078) (36)	890,2 117	± 217 ± 52	1113 92	± 477 ± 41	(213) (19)
MDH	55644 3767	± 8887 ± 1866	± 9150 ± 418	(4092) (187)	15692 1909	± 8086 ± 847	17107 1410	± 7418 ± 678	(3315) (303)
GPT	307 20,8	± 48 ± 10,2	± 111 ± 5,3	(50) (2,4)	141 21,9	± 29 ± 17,6	228 18,5	± 81 ± 7,1	(36) (3,2)
GOT	1387 101	± 586 ± 65	± 849 ± 33	(380) (15)	357 51	± 74 ± 27,6	534 43,8	± 196 ± 18,6	(88) (8,3)
Glu-DH	132 9,2	± 26 ± 5,4	± 19 ± 1,2	(9) (0,5)	63,6 8,9	± 16,4 ± 5,8	69,9 6,1	± 17,4 ± 3,5	(7,8) (1,6)

Tabelle 11: Enzymaktivitäten vor und 60' nach Injektion von 100 mg Pept. A/kg KGW im subcutanen Fettgewebe des Miniaturschweines = Angegeben sind jeweils $\bar{x} \pm s_x(s_x)$; obere Zeile jeweils in mU/gfGw. und untere Zeile in mU/mgEP.

FETTGeweBE

LEBERGeweBE

Enzyme	Vor Pept. A-Gabe		Nach 100 ug Pept. A		Vor Pept. A-Gabe		Nach 100 ug Pept. A								
G-6-PDH	324 65,1	± ±	(21) (10)	333 59	± ±	149 28	(53) (10)	1662 15,2	± ±	382 2,7	(144) (1,0)	1608 14,3	± ±	256 3,8	(85) (1,3)
6-PGDH	171 34	± ±	(25) (6,9)	167 30,2	± ±	51 13,2	(18) (43)	1506 13,8	± ±	222 1,8	(83) (0,7)	1549 13,5	± ±	262 2,0	(81) (0,7)
GPM	477 89,5	± ±	(56) (9,3)	530 93,9	± ±	102 27	(36) (9,6)	63756 585	± ±	7412 61	(2802) (23)	67326 588	± ±	7324 92	(2447) (31)
HK	30,6 6,4	± ±	(4,3) (1,7)	27,4 5,3	± ±	5,3 2,9	(1,9) (1,0)	317 2,9	± ±	71 0,9	(27) (0,4)	292 2,6	± ±	80 1,0	(27) (0,3)
Gluko- kinase	nicht bestimmt			nicht bestimmt				1438 13,4	± ±	355 3,8	(134) (1,4)	1523 13,7	± ±	452 5,4	(151) (1,8)
PK	186 34,6	± ±	(28) (4,7)	240 43,7	± ±	140 30	(50) (11)	8195 74,5	± ±	2571 18,4	(972) (7,0)	8924 79,0	± ±	3321 32	(1107) (10,7)
PFK	76,4 16,6	± ±	(33) (7,9)	40,4 6,37	± ±	37,8 4,4	(13) (1,5)	1606 14,7	± ±	609 5,3	(230) (2,0)	1960 17,60	± ±	474 6,3	(150) (2,1)
GDH	8227 1619	± ±	(1589) (380)	9064 1696	± ±	4259 1071	(1506) (379)	38290 352	± ±	11515 110	(4353) (42)	44582 398	± ±	12647 142	(4213) (47)
MDH	15638 3227	± ±	(1684) (679)	13971 2443	± ±	3588 755	(1269) (267)	127961 1182	± ±	30263 307	(11442) (116)	135274 1188	± ±	25121 252	(837) (84,2)
GK	nicht bestimmt			nicht bestimmt				477 4,32	± ±	125 1,1	(47) (0,4)	437 3,83	± ±	134 1,31	(45) (0,44)
ME	23,5 4,8	± ±	(5,1) (1,2)	28,8 5,09	± ±	8,6 1,75	(3,5) (0,71)	57,0 0,5	± ±	46,6 0,41	(23,3) (0,2)	49,8 0,9	± ±	25,1 0,7	(8,9) (0,21)
CCE	23,0 4,4	± ±	(3,9) (0,7)	29,4 4,9	± ±	18,3 2,8	(6,5) (1,0)	154 1,41	± ±	47,6 0,4	(18) (0,15)	177 2,66	± ±	62 3,0	(21) (1,02)
PDE	6,06 1,61	± ±	(0,6) (0,31)	7,39 1,39	± ±	4,0 0,42	(1,4) (0,15)	139 1,15	± ±	26 0,33	(9,9) (0,12)	198 1,63	± ±	100 0,82	(33) (0,27)

Tabelle 12: Enzymaktivität im perirenal Fettgewebe und der Leber des Kaninchens vor (n = 7) und 60' nach (n = 8) Injektion von 100 ug Pept. A/kg Körpergewicht. Angegeben sind jeweils $\bar{x} \pm s_x$ (s_x); oben in mU/gFgew. und unten mU/mg EP.

Zusammenstellung der Zeichnungen

Zeichnung

- Nr. 1: Langzeitkinetik beim Minipig in FFS
- Nr. 2: Langzeitkinetik beim Minipig in FG
- Nr. 3: DWK beim Schwein für FFS und FG
- Nr. 4: Langzeitkinetik beim Hasen in FFS
- Nr. 5: Langzeitkinetik beim Hasen in FG
- Nr. 6: DWK beim Hasen für FFS und FG
- Nr. 7: Altersabhängige Reaktion auf Pept. A für FFS und FG
- Nr. 8: Gewichtsabhängige Reaktion auf Pept. A für FFS und FG
- Nr. 9: Enzymaktivität im subcutanen Fettgewebe dreier Alterskollekt
beim Minipig (/g FGew.)
- Nr.10: Enzymaktivität im subcutanen Fettgewebe dreier Alterskollekt
beim Minipig (/mg EP)
- Nr.11: Enzymaktivitäten in der Leber des Miniaturschweines in mU/g
und mU/mg EP
- Nr.12: Enzymaktivitäten im subcutanen Fettgewebe des Miniatur-
schweines vor und nach Pept. A-Gabe in mU/g FGew.
- Nr.13: Enzymaktivitäten im subcutanen Fettgewebe des Miniatur-
schweines vor und nach Pept. A-Gabe in mU/mg EP
- Nr.14: Enzymaktivität im perirenal Fettgewebe und in der
Leber vom Kaninchen vor und nach Pept. A-Gabe in mU/g FGew.
- Nr.15: Enzymaktivität im perinalen Fettgewebe und in der Leber
vom Kaninchen vor und nach Pept. A-Gabe in mU/mg EP

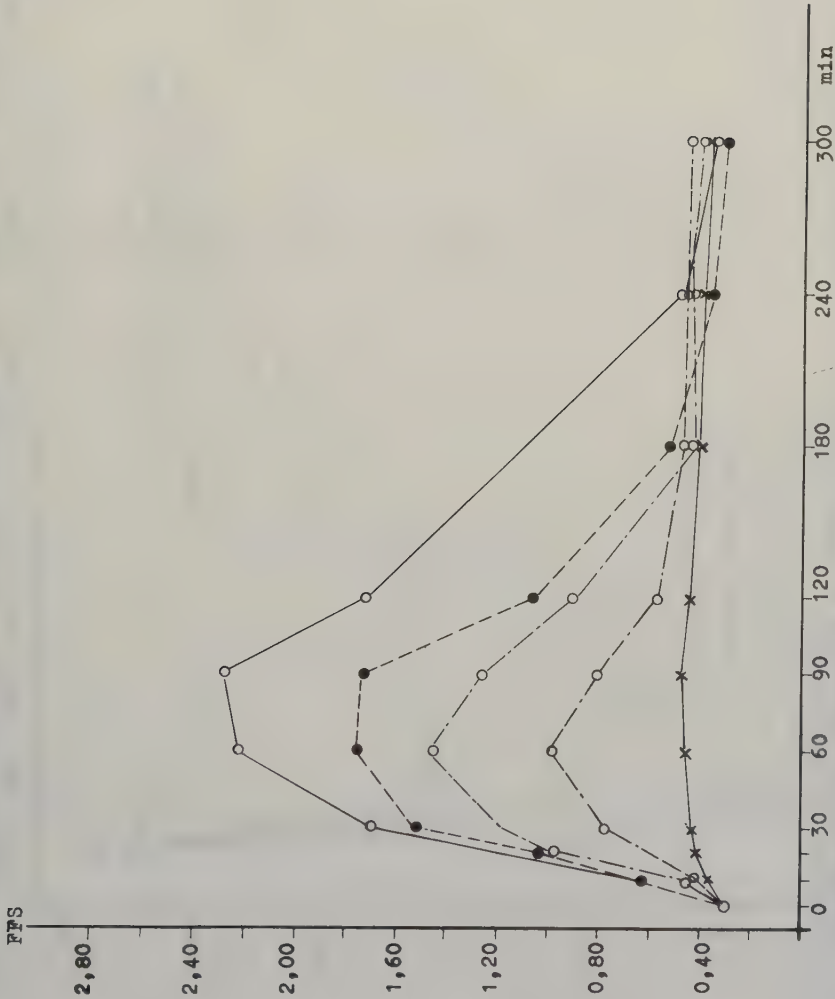


Abb. 1: Freie Fettsäuren (FFS) im Serum des Miniaturetschweins zu verschiedenen Zeitpunkten nach Injektion der angegebenen Mengen Pept. A (FFS in mVal/l) - Standardabweichung siehe Tabelle!
 x—25 µg/kg (n=5) ; ○—50 µg/kg (n=4) ; ○—75 µg/kg (n=3) ; ●—100 µg/kg (n=5) ; ●—150 µg/kg (n=4).

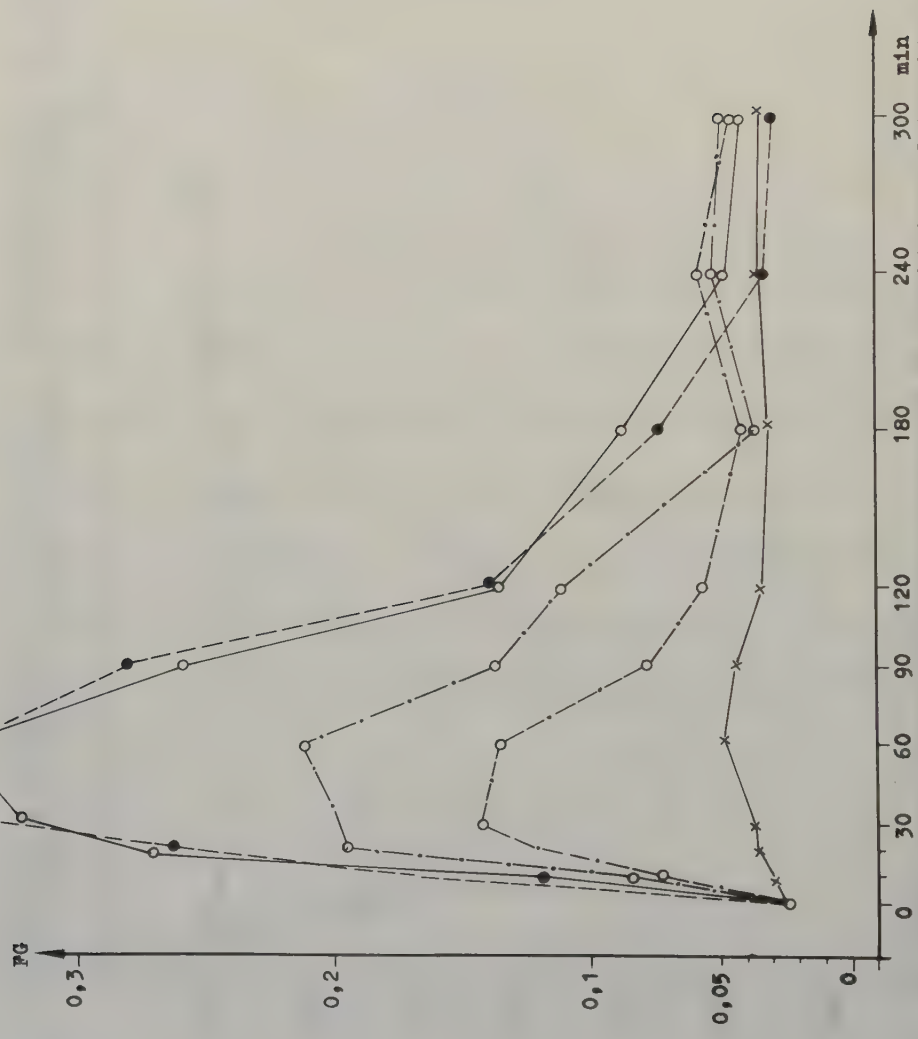
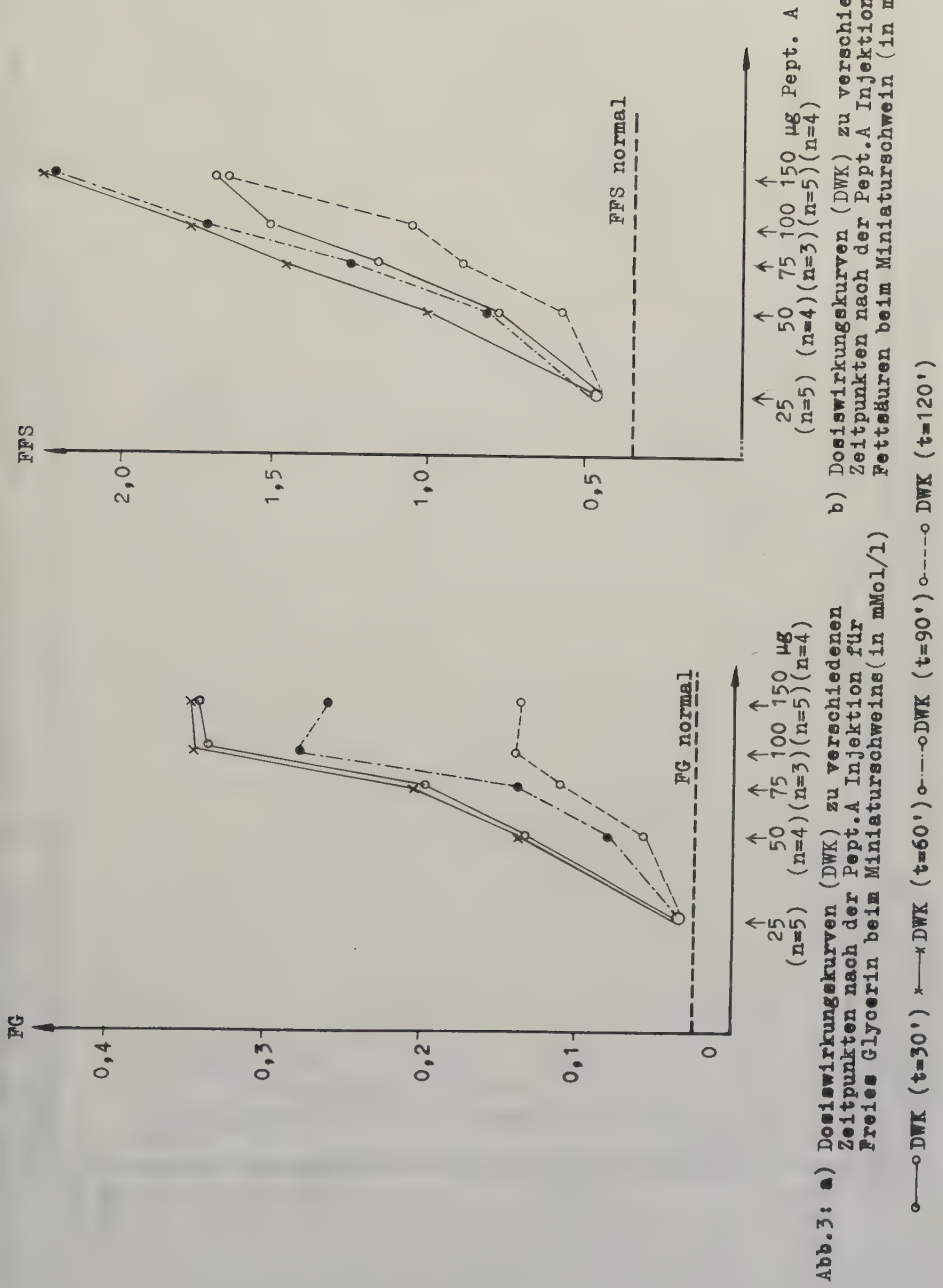


Abb. 2: Freies Glycerin im Serum des Miniaturechweins zu verschiedenen Zeitpunkten nach Injektion der angegebenen Mengen Pept.A (PG in mMol/l-Standardabweichung siehe Tabelle).



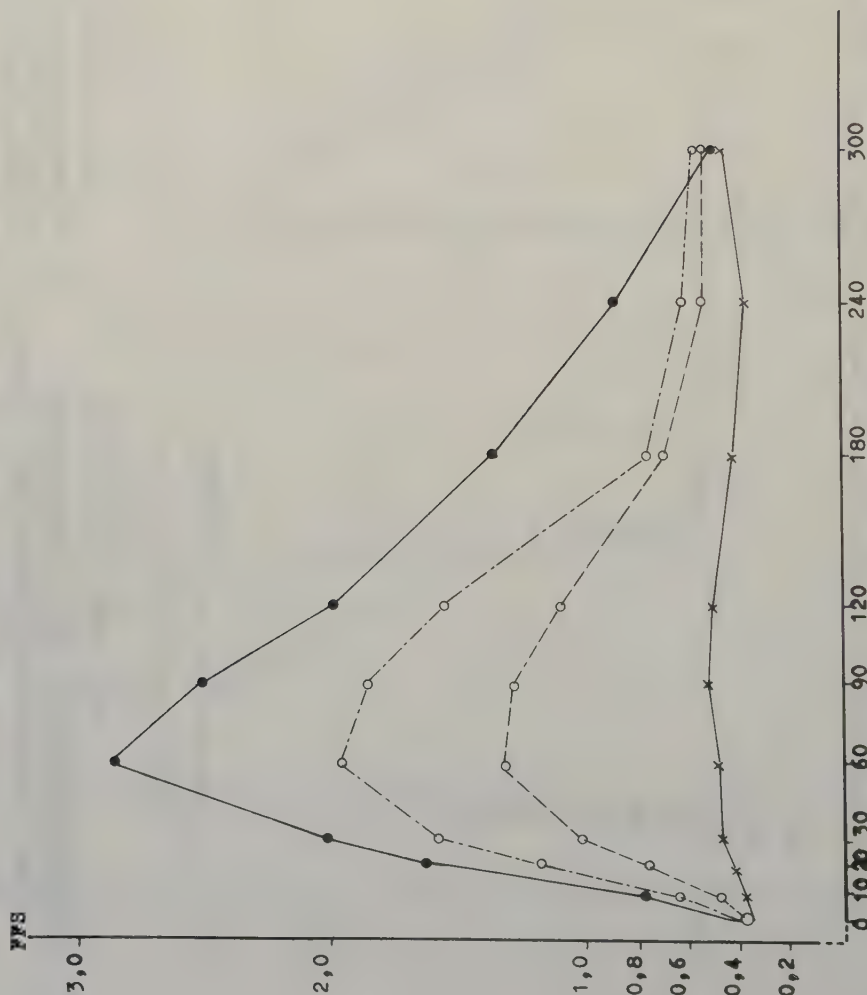


Abb. 4: Freie Fettsäuren im Serum von Kaninchen zu verschiedenen Zeitpunkten nach Injektion der unten angegebenen Mengen Pept. A (FFS in mVal/l) - Standardabweichung siehe Tabelle!

x — 25 µg/kg (n=5) o — 50 µg/kg (n=6) • — 75 µg/kg (n=5) x — 100 µg/kg (n=6)

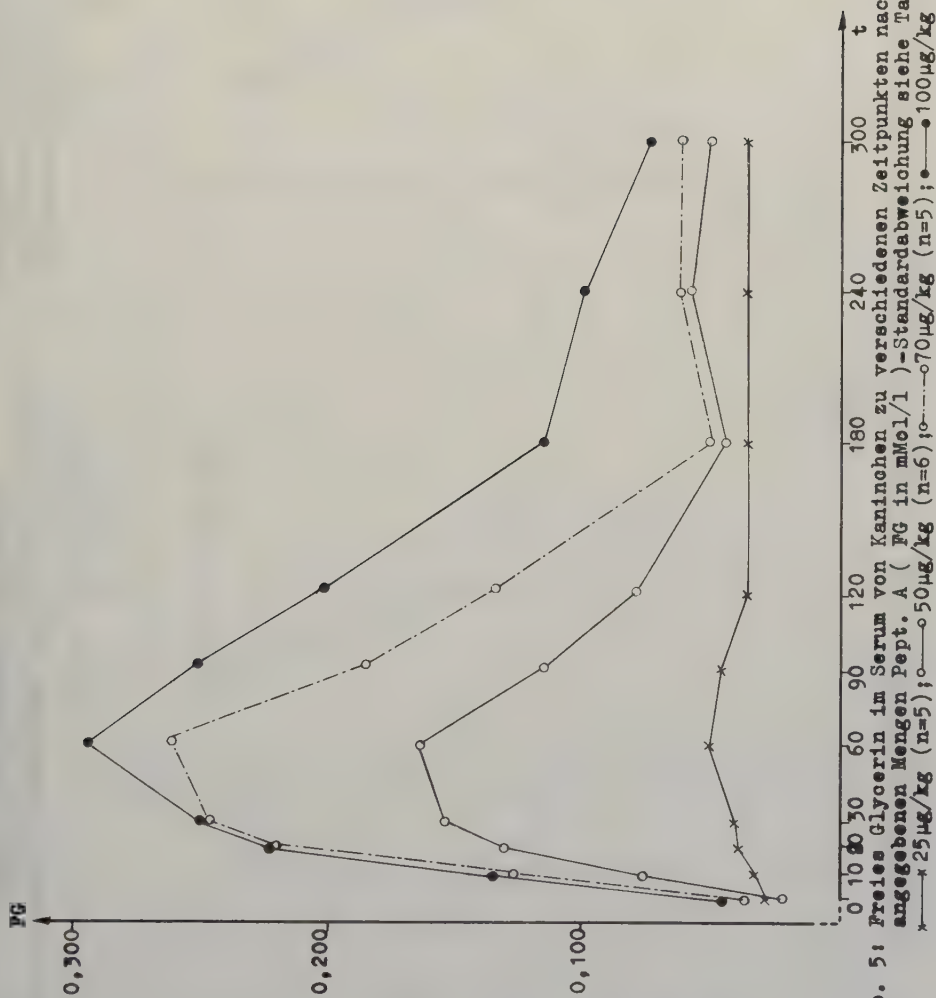
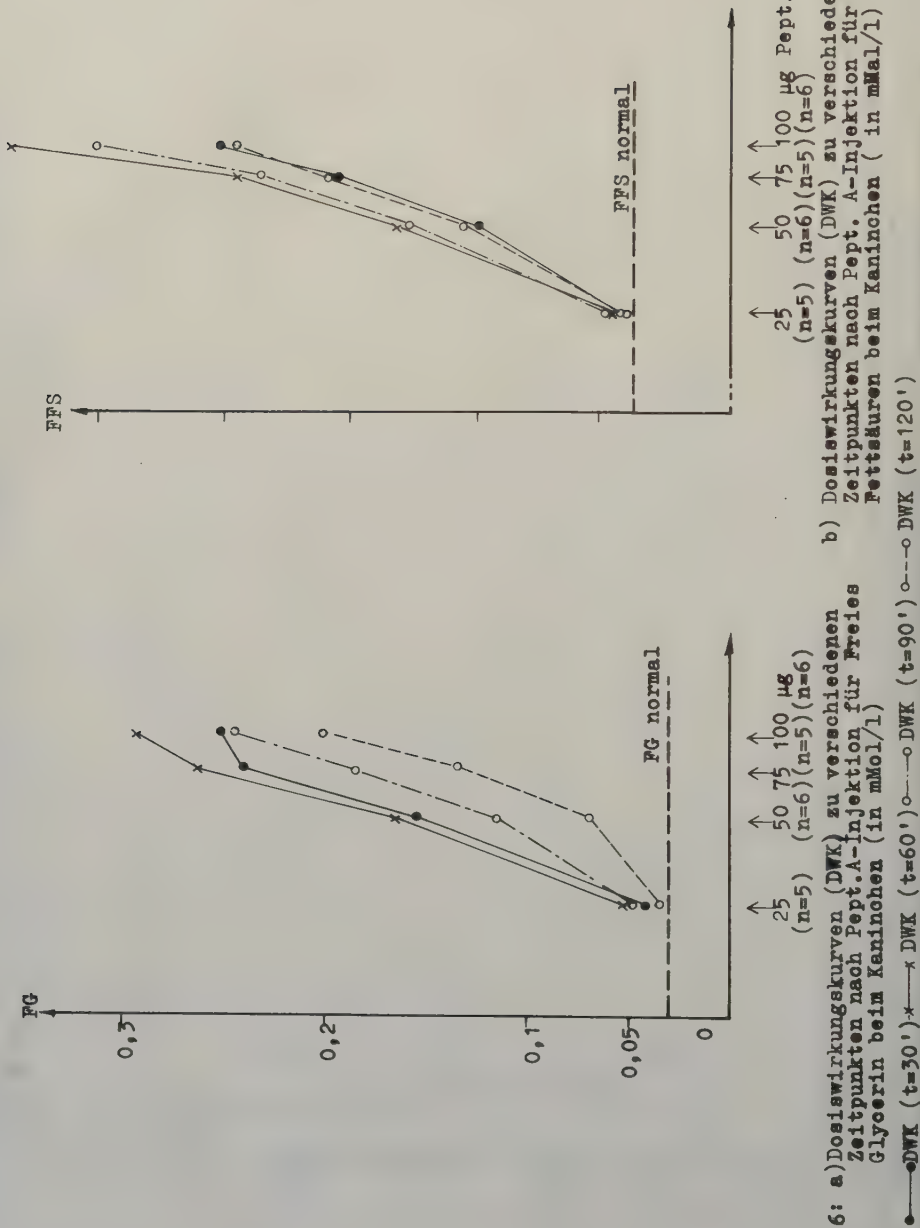


Abb. 5: Freies Glycerin im Serum von Kaninchen zu verschiedenen Zeitpunkten nach Injektion der unten angegebenen Mengen Pept. A (PG in mmol/l) -Standardabweichung siehe Tabelle!
 x — 25 µg/kg (n=5); o — 50 µg/kg (n=6); o — 70 µg/kg (n=5); • — 100 µg/kg (n=6);



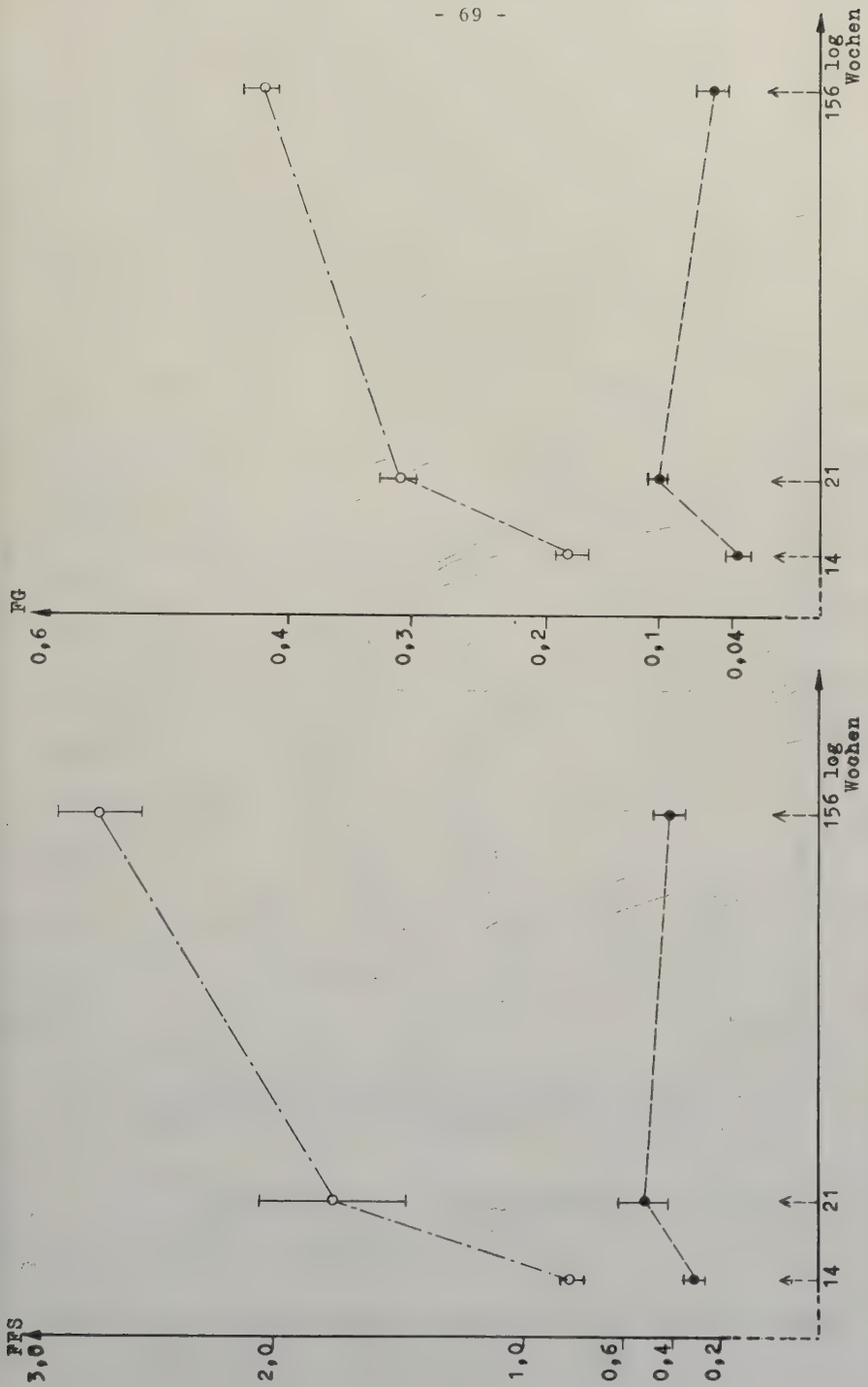


Abb. 7: Lipolytische Reaktion 60' nach Injektion von 100 $\mu\text{g/kg}$ Pept. A bei 14, 21 und 156 Wochen alten Miniaturenschweinen - FPS und FG - angegeben sind jeweils $\bar{x} \pm s$ (in mval/l bzw. mmol/l)

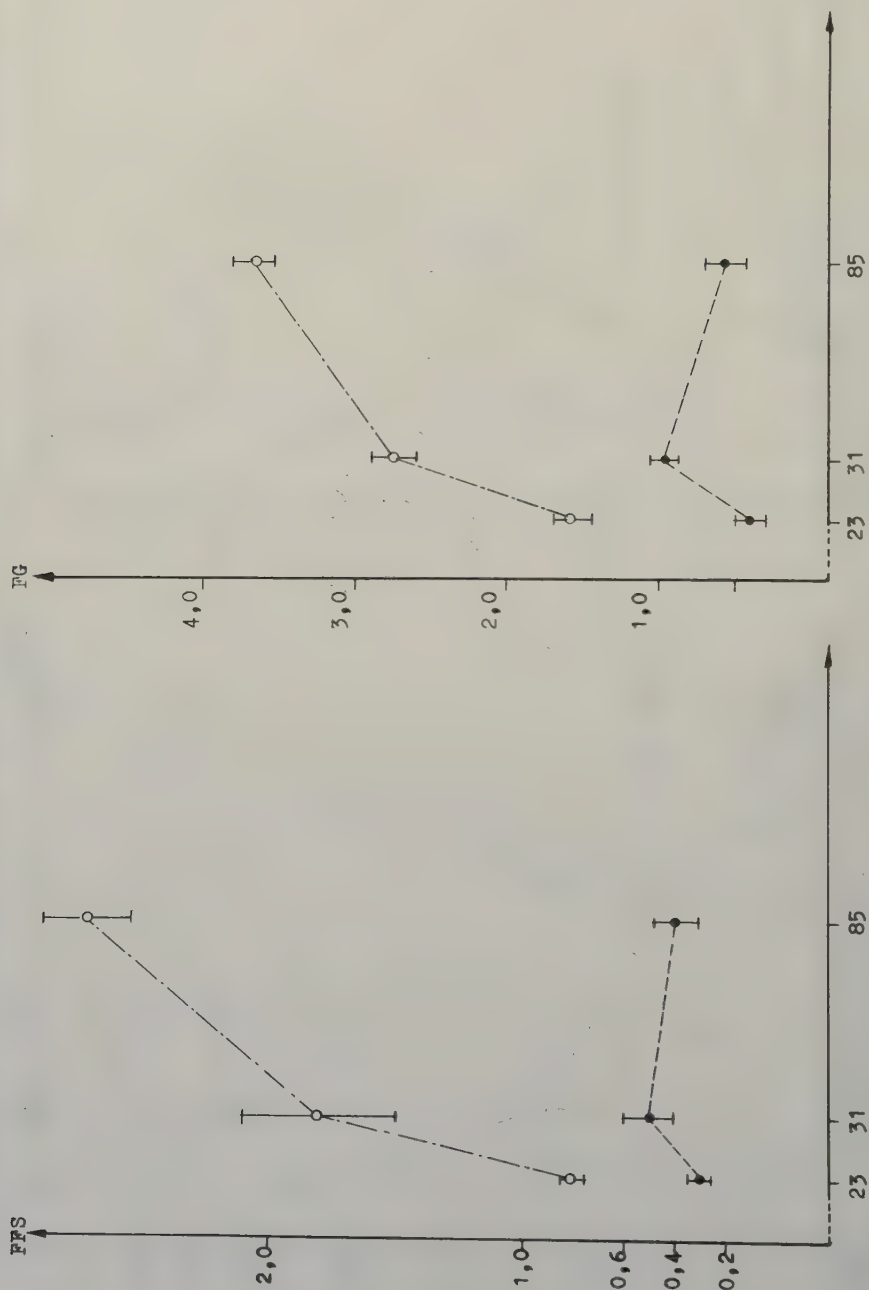


Abb. 8: Lipolytische Reaktion 60' nach Injektion von 100 µg/kg Pept. bzw. NaCe A bei 23, 31 und 85 kg schweren Miniaturenschweinen-PPS und PG- angegeben sind jeweils $\bar{x} \pm s$ (in mVal/l bez. mMol/l)

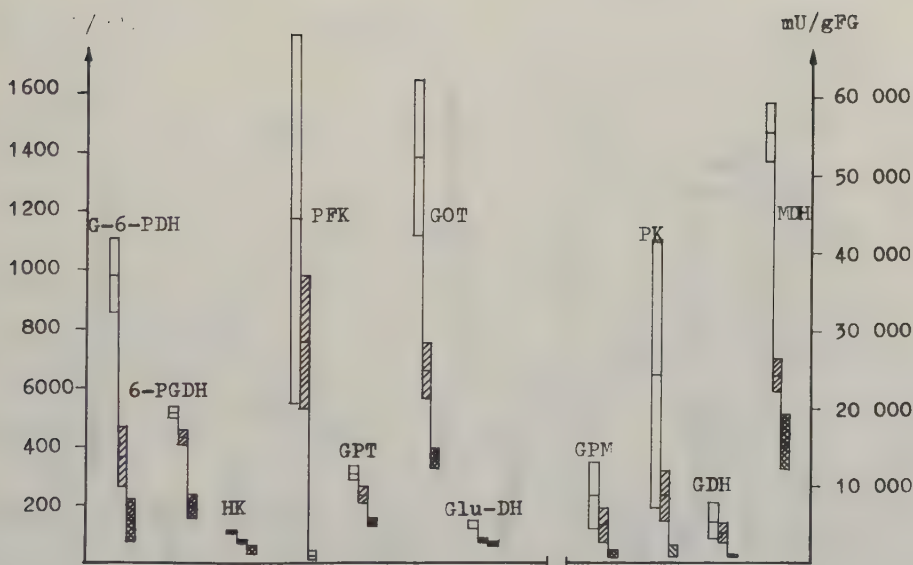


Abb. 9

Enzymaktivitäten im Fettgewebe dreier Alterskollektive vom Minipig in mU/g Frischgewicht.

$\bar{x} + S_{\bar{x}}$

□ = 14 Wochen (n = 5), ▨ = 21 Wochen (n = 9), ■ = 156 Wochen (n = 5).

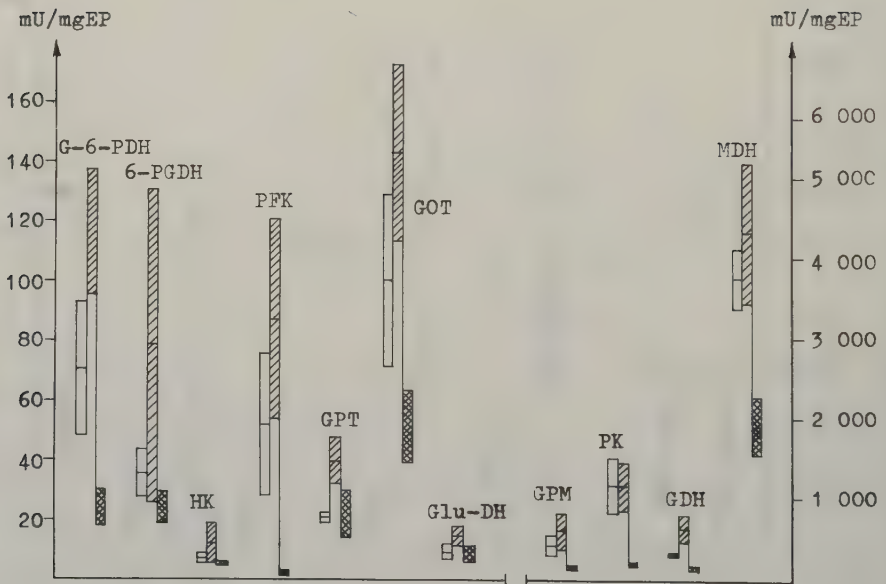


Abb. 10: Enzymaktivitäten im Fettgewebe dreier Alterskollektive von Minipig in mU/mg Extraktprotein.

$\bar{x} + S$, $\bar{x}$, $\square$ = 14 Wochen (n = 5), hatched = 21 Wochen (n = 9), checkered = 156 Wochen (n = 5).

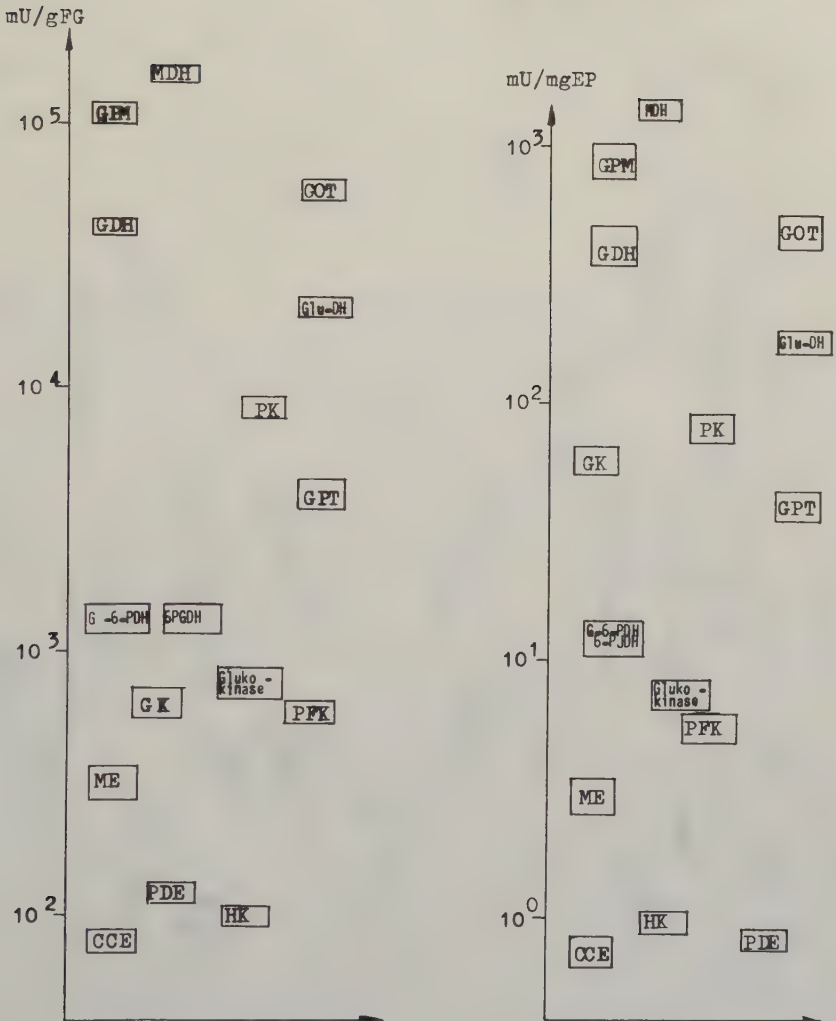


Abb.11: Enzymaktivitäten im Lebergewebe 21 Wochen alter Miniaturschweine in mU/gFGw und mU/mg EP. Angegeben sind jeweils $2\bar{x}$ im semilogarithmischen Maßstab.

14 Wochen alte Minipigs (n = 5)

3 Jahre alte Minipigs (n = 5)

- vor Pept. A
 nach Pepts. A
 (100 μ g/kg KGw)

mU/g FrG.

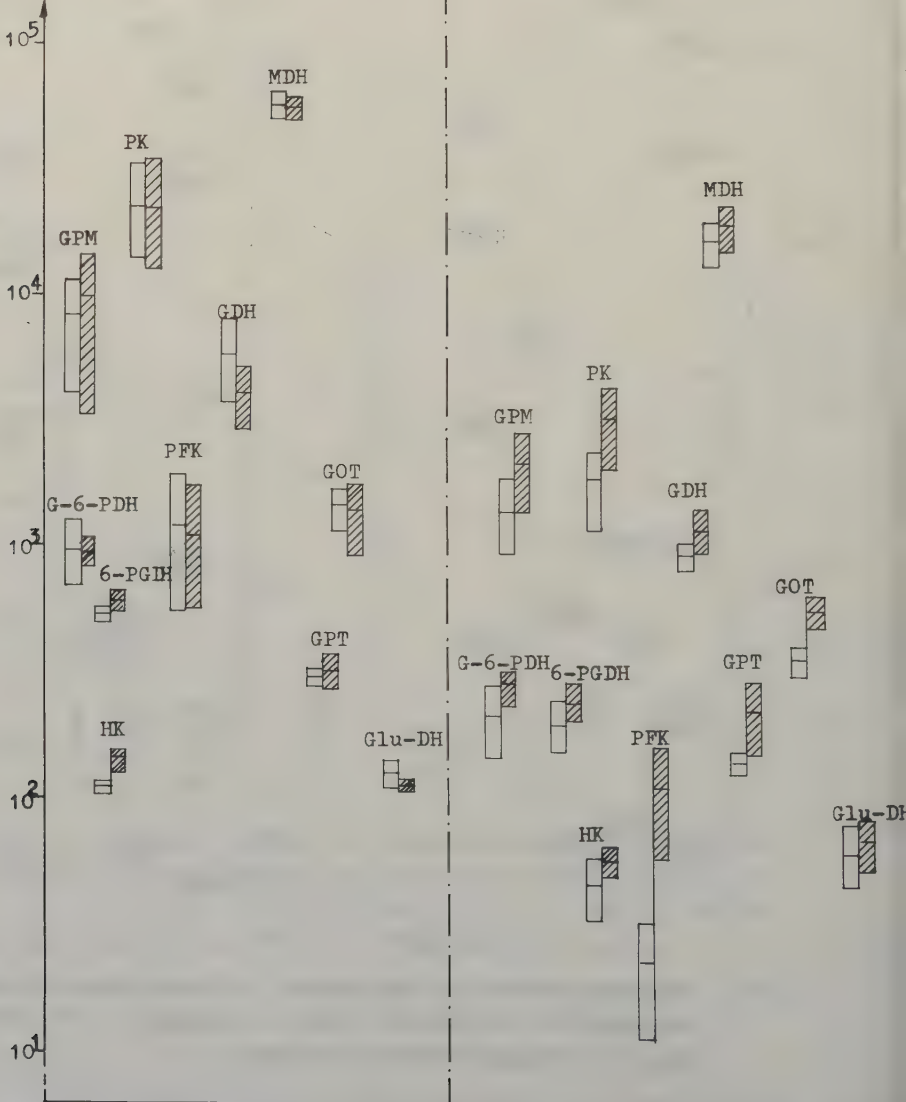


Abb.12: Enzymaktivitäten im subcutanen Fettgewebe des Miniaturschweins vor (leere Kästchen) und 60' nach Injektion von 100 μ g/kg KGw Pept. A,

Angegeben sind in halblogarithmischen Maßstab $\bar{x} \pm S$

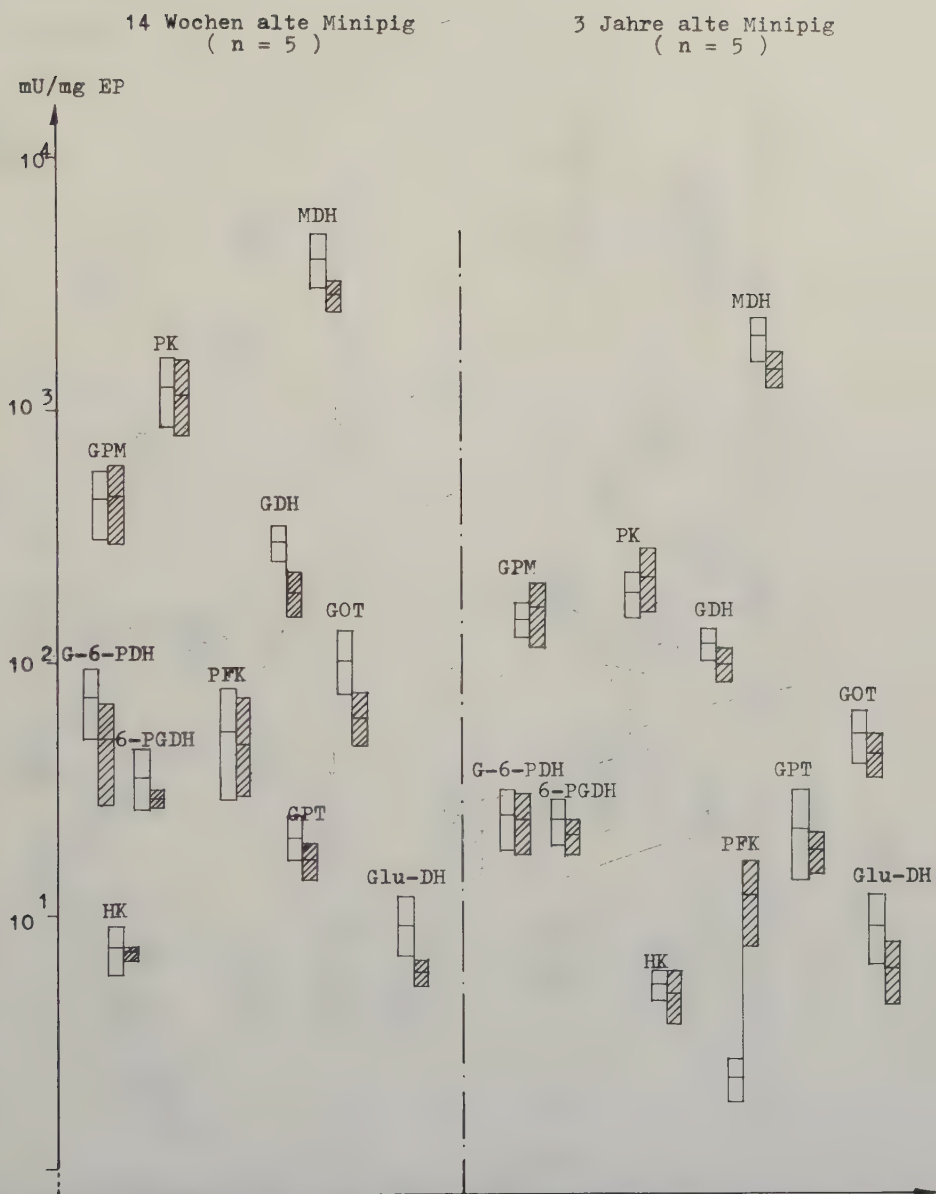


Abb.13: Enzymaktivitäten im subcutanen Fettgewebe des Miniaturschweins vor (leere Kästchen) und 60' nach Injektion von 100 µg/kg KGw Peptid A in mU/mg Extraktprotein. Angegeben sind in halblogarithmischem Maßstab $\bar{x} \pm S$ vor Pept. A; nach Pept. A (100 µg/kg Körpergewicht).

Perirenales Fettgewebe

Lebergewebe

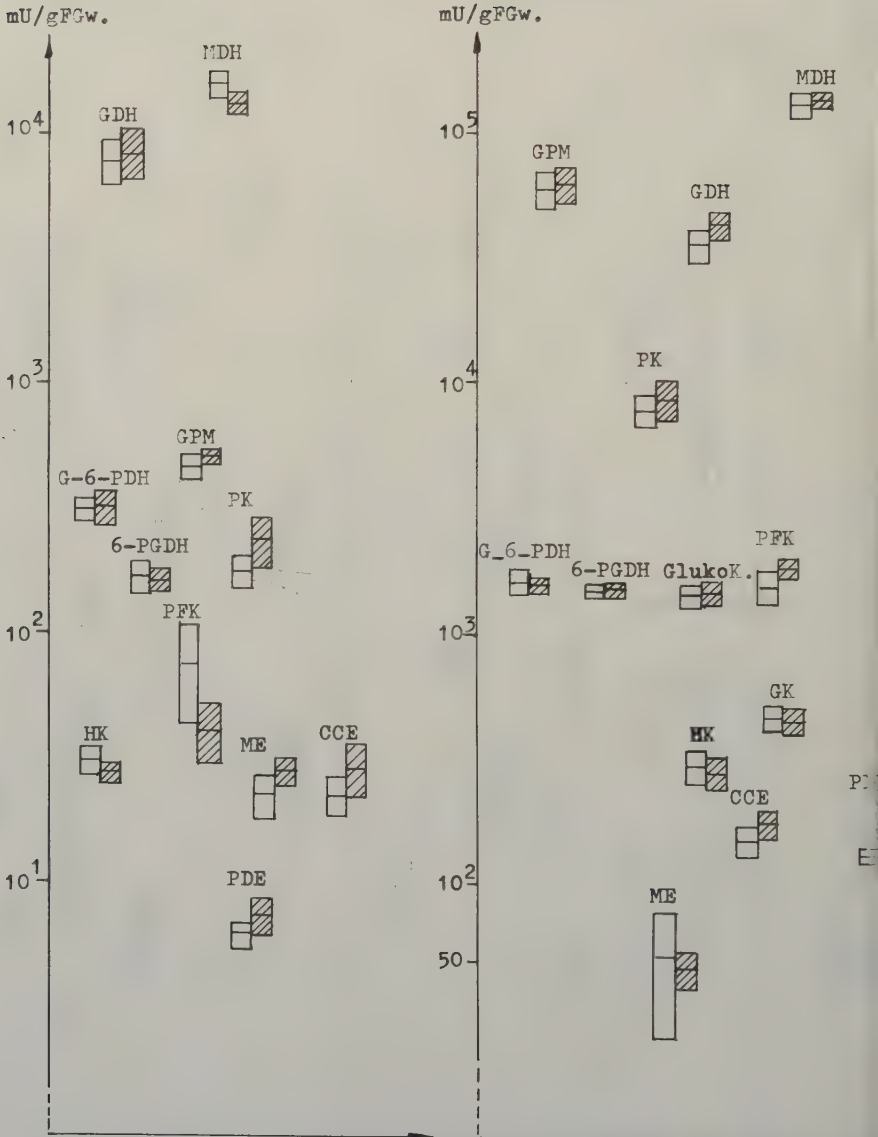


Abb.14: Enzymaktivitäten im perirenaln Fettgewebe und Lebergewebe von Kaninchen vor und 60' nach Injektion von Pept. A. Angegeben sind $\log \bar{x} \pm s_{\bar{x}}$ in mU/gFGw.

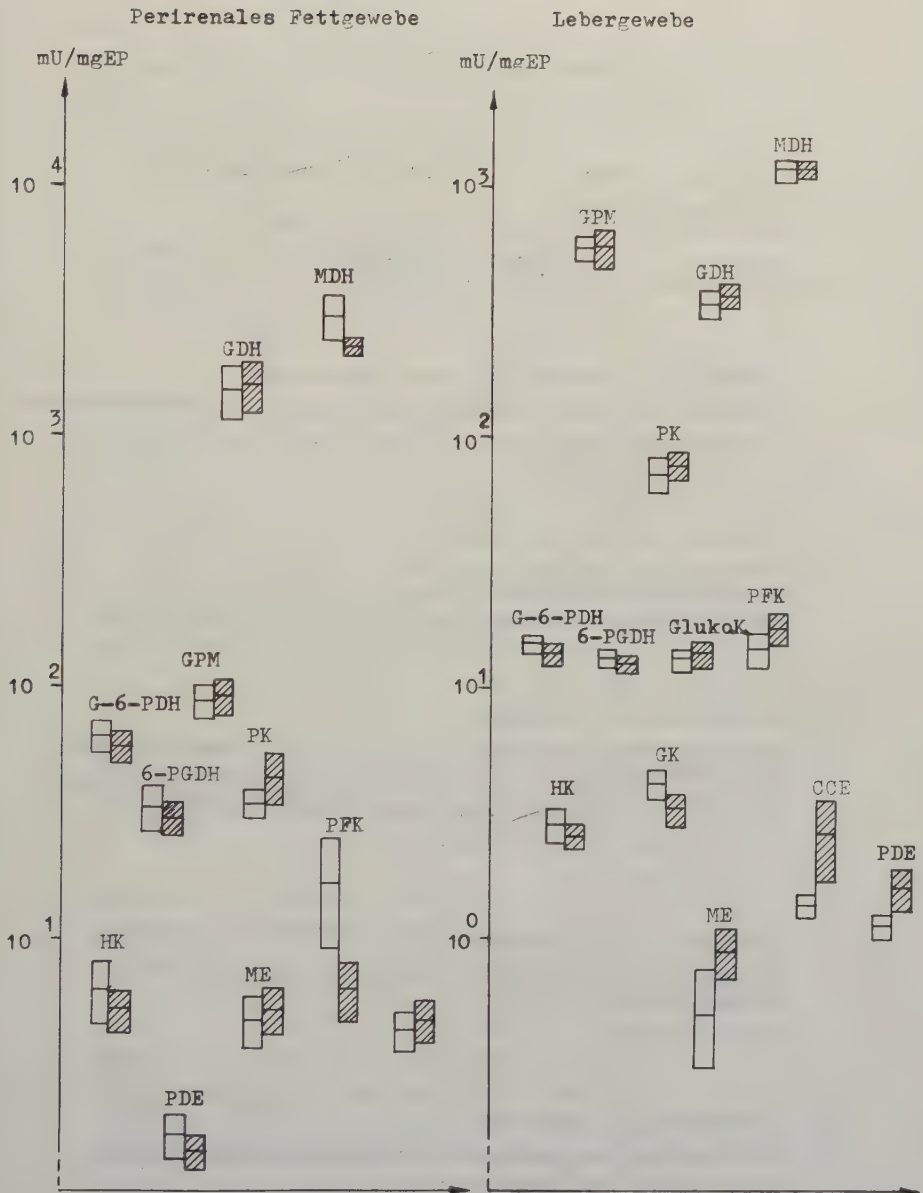


Abb. 15: Enzymaktivität im perirenal Fettgewebe und in der Leber vor und 60' nach Pept. A-Gabe. Angegeben sind $\log \bar{x} \pm s_{\bar{x}}$ in mU/mgEP.

L I T E R A T U R V E R Z E I C H N I S

- 1 ALLEE G.L., ROMSOS D., LEVEILEE G.A. and BAKER D.H.
"Influence of Age on 'in Vitro' Lipid Biosynthesis
and Enzymatic Activity in Pig Adipose Tissue"
Proceeding of the Society for Experimental Biology
and Medicine: 137, 449 - 452 (1971)
- 2 ALLMANN D.W., HUBBARD J.D. and GIBSON D.M.
Fatty acid synthesis during fed-free refeeding of starved rats
J. Lipid Res. 6, 63 (1965)
- 3 ANDERSON D.B. and KAUFFMAN
"Cellular and enzymatic changes in porcine adipose
tissue during growth"
Journal of Lipid Research Vol. 14 pp. 160 - 168 (1973)
- 4 ANSELMINO K.J., HOFFMANN F.
Über die Beteiligung der Hypophyse an der Entstehung des
Diabetes mellitus
I. Mitt.: Nachweis einer Störung hypophysärer Regulations-
mechanismen beim Diabetes mellitus
Z. Klin. Med. 129, 24 (1936)
- 5 ANSELMINO K.J., HOFFMANN F.
Zur Darstellung des Fettstoffwechselhormons des
Hypophysenvorderlappens
Endokrinologie 17, 1 (1936)
- 6 ANSELMINO K.J., HOFFMANN F.
Das Fettstoffwechselhormon des Hypophysenvorderlappens
Klin. Wschr. 10, 2380 (1931)

- 7 ASTWOOD E.B., BARRETT R.J. and FRIESEN H.
Two Metabolically Active Peptides from Porcine
Pituitary Glands
Proc. Nat. Acad. Sc. 47, 1525 (1961)
- 8 BALLARD J.F. and HANSON W.R.
Changes in Lipid Synthesis in Rat liver during Development
Biochem. J. 102, 952 (1967)
- 9 BARANOWSKI T.
Crystalline Glycerophosphate Dehydrogenase from Rabbit
Muscle
J. Biol. Chem. 180, 535 (1949)
- 10 BEATON J.R., SLAVKO A.J., STEVENSON J.A.F.
Observations on the lipolytic action in vitro of a fat-
mobilizing substance extracted from urine of fasting rats
Canad. J. Physiol. Pharmacol. 44, 103 (1966)
- 11 BECKER D.E., ULLREY D.F., TERRIL S.W. and NOTZOLD R.A.
Science 120, 345 (1954)
- 12 BLACKARD W.G. and APRILL Ch.N.
Mechanism of Action of Diaxozide
J. Lab. Clin. Med. 69, 960 (1967)
- 13 BONSNES R.W. and WHITE A.
Fractionation of Saline Extracts of Anterior
Pituitary Tissue
Endocrinology 26, 990 (1940)

- 14 Von BRAND V. und HELMREICH E.
Beziehung der Glycolyse zum Fettstoffwechsel
Die Transportfunktion der Pyridincoenzyme im Zusammenspiel von Glycolyse, Atmung und Fettsynthese
Biochem. Zeitschrift, Bd. 328, S.146 - 162 (1956)
- 15 BRAY G.A., TRYGSTAD O.
Lipolysis in human adipose tissue. Comparison of human pituitary hormones with other lipolytic agents
Acta endocr. 70, 1 (1972)
- 16 BRECH W.J. und GORDON E.S.
Die physiologische Rolle des Fettgewebes
Klin. Wschr. 45, Heft 12, S.905 - 917 (1967)
- 17 BRÜCKMANN und ZONDEK
Biochem. J. 33, 1845 (1939)
- 18 BÜCHER TH., LUH W. und PETTE D.
Einfache und zusammengesetzte Tests mit Pyridinnucleotiden
Hoppe-Seyler/Thierfelder, Handb. physiol. pathol. chem. Anal. Bd. VI (1964) p 291
- 19 BUSTAD L.K., HORSTAN V.G. and ENGLAND D.C.
Development of Hanford miniature swine.
- in: Swine in Biomedical Research (1966) 769
Biology Department, Battelle-Northwest,
Richland, Washington/USA
- 20 BURNS J.H. and LING H.W.
The Effect of Insulin on Acetonis
J. Physiol. (Lond.) 65, 191 (1928)

- 21 CAMPBELL J., MARTUCCI A.D. and GREEN G.R.
Plasma Albumin as an Acceptor of Free Fatty Acids
Biochem. J. 93 (1964) 183

- 22 CHALMER T.M.
Lipid mobilizing activity during fasting
Handbook of physiol. II p. 549 eds.
A.E. Renold, G.F. Cahill jr., Adipose tissue
Washington: Amer. Physiol. Soc. 1965

- 23 CHRETIEN M., DAVIGNON J., CHARI P.V., AUBRY F., GILARDEAU C.
Lipolytic and hypocalcemic effects of sheep betalipotrophic hormone
Canad. J. Physiol. Pharmacol. 48, 762 (1970)

- 24 CHRETIEN M., GILARDEAU C., LI CH.
Revised structure of sheep beta-lipotrophic hormone
Int. J. Peptide Res. 4, 263 (1972)

- 25 CSEH G., GRAF L., GOTH E.
Lipotrophic hormone obtained from human pituitary gland
Feds. Lett. 2, 42 (1968)

- 26 CHRETIEN M. and LI CH.
Isolation, Purification and Characterization of gamma -
Lipotrophic Hormone from Sheep Pituitary Glands
Can. J. Biochem. 45, 1163 (1967)

- 27 COOPE R. and CHAMBERLAIN E.N.
The Effect of Pituitin on the Fatty Acid of the Liver
J. Physiol. (Lond.) 60, 69 (1925)

- 28 DELBRÜCK A., ZEBE E. und BÜCHER TH.
Über Verteilungsmuster von Enzymen des Energie liefernden
Stoffwechsels im Flugmuskel, Sprungmuskel und Fettkörper
von Locusta Migratoria und ihre cytologische Zuordnung
Biochem. Z. 331 (1959) 273
- 29 DESRANBEAU R., GILARDEAU C., CHRETIEN M.
Radioimmunoassay of ovine beta-lipotropic hormone
Endocrinology 91, 1004 (1972)
- 30 DI PIETRO D.L.
Hexokinase of White Adipose Tissue
Biochem. Biophys. Acta 67 (1963) 305
- 31 DITSCHUNEIT H.
"Die hormonelle Regulation von Lipolyse und Lipogenese
des Fettgewebes"
Therapiewoche Heft 45: 2015 - 2021
- 32 DOCUMENTA GEIGY (Basel)
"Wissenschaftliche Tabellen" 7.Auflage (1968)
- 33 DOERR H.W.
Enzymaktivitäten des Fettgewebes im Hinblick auf ihre
klinische Bedeutung
Inaugural-Dissertation - München 1971
- 34 DOLE V.P. and MEINERTZ H.
Microdetermination of long-chain Fatty Acids in Plasma
and Tissue
J. Biol. Chem. 235, 2595 (1960)

- 35 EGGSTEIN M., KREUTZ F.H.
Eine neue Bestimmung der Neutralfette im Blutserum
und Gewebe
Klin. Wschr. 44, 262 (1966)
- 36 ENGELHARDT A., HAGEMANN K., JAHNKE K.
Enzyme des energieliefernden Stoffwechsels im menschlichen
Fettgewebe
Enzym-biol. Clin. 9 (1968) 287
- 36a FISCHER H.O.L.
Chemische Synthesen von Zwischenprodukten des
Zuckerstoffwechsels.
in: Neuere Methoden der präoperativen organischen Chemie,
Bd. II, p. 173
Herausg. W. Foerst, Verlag Chemie, Wertheim
- 37 FLATT J.P. and BALL E.G.
Studies on the metabolism of adipose tissue
XIX An evaluation of the mayor pathway of glucose catabolism
as influenced by acetate in the presence of insulin
J. Biol. Chem. 241, 2862 (1966)
- 38 FRIESEN H.
Hypocalcemic effect of pituitary polypeptides in rabbits
Endocrinology 75, 692 (1964)
- 39 FRIESEN H., ASTWOOD E.B.
Changes in neurohypophysial proteins induced by dehydration
and ingestion of saline
Endocrinology 80, 278 (1967)
- 40 FRIESEN H., BARRET R.J., ASTWOOD E.B.
Metabolic effects of two peptides from the anterior
pituitary gland
Endocrinology 70, 579 (1962)

- 41 FUSSGÄNGER R.D., SCHLEYER M., PFEIFFER E.F.
Correlative insulin and glucagon secretion of the perfused
rat pancreas following pituitary peptides
Acta endocr. Suppl. 173, 105 (1973)
- 42 GILKES J.J.H., BLOOMFIELD G.A., SCOTT A.P.,
LOURY P.J., RATCLIFFE J.G., LANDON J., REES L.H.
Development and validation of a radioimmuno assay
for peptides related to beta-melanocyte-stimulating hormone
in human plasma: the lipotropines
J. Clin. Endocrin. Metabol. 40, 450 (1975)
- 43 GIBSON D.M.
The biosynthesis of fatty acids
J. Chem. Educat. 42, 236 (1956)
- 44 GIROLAMO M.D., MEDLINGER B.S.
Glucose metabolism and Responsiveness to Bovine
insulin by Adipose Tissue
Biochem. J. 108, 667 (1968)
- 44a GOTH E., HEDGEDUS A.
Fat-mobilizing substance in the urine of patients
with diabetes and with pituitary diseases and the
effect of Insulin on its action
Experimentia (Basel) 21, 277 (1965)
- 45 GORDON E.S. and GOLDBERG M.
Carbon-14-Studies of Energy Metabolism in Various Thyroid States
Metabolism 13 (1964): 591
- 46 GRAF L. and CSEH G.
Isolation of Porcine beta-lipotrophic Hormone
Acta Biochem. Biophys. Acad. Sci. Hung 3, 175 (1968)

- 47 GRAF L., CSEH G. and MEDIZIHRADSZKY-SCHWEIGER H.
Isolation of gamma-lipotropic Hormone from Porcine
Pituitary Glands
Biochem. Biophys. Acta 175, 444 (1969)
- 48 GRIES F.A., BERGER M. und OBERDISSE K.
"Untersuchungen zum antilipolytischen Effekt des
Insulins am menschlichen Fettgewebe in vitro"
Diabetologica 4, 262 - 267 (1968)
- 49 HALES C.N., RANDLE P.J.
Immunoassay of insulin by isotope dilution
Biochem. J. 84, 79, 1962
- 50 HENDERSON J.R.
"Serum-Insulin or Plasma-Insulin?"
The Lancet Sept. 12 (1970)
- 51 HOFFMANN F., ANDELMINO K.J.
Das Fettstoffwechselhormon des Hypophysenvorderlappens
II. Stoffwechselwirkungen und -regulationen des Hormons
Klin. Wschr. 10, 2383 (1931)
- 51a HOHORST H.J., KREUTZ F. and REIM M.
Steady State Equilibria of some DPN-Linked Reaktionen
Biochem. Biophys. Res. Commun. 4 (1961): 159
- 52 HOLLETT C.R.
A Lipid-mobilizing substance from the calf mid-brain
Biochem. biophys. Res. Commun. 30, 600 (1968)

- 53 HOLLETT C.R.
Some properties of a lipid mobilizing substance
from the calf mid-brain
Biochem. biophys. Acta (Amst.) 176, 511 (1969)
- 54 HORECKER B.L.
Stoffwechselwege der Kohlehydrate: ihre Regulierung
und physiol. Bedeutung
Medizin und Ernährung 10, Heft 4, S. 66 - 69 (1969)
- 55 HORECKER B.L. and SMYRNIOTIS P.S.
in: Colonick-Kaplan. Meth. Enzymol.
Band 1 S.323
- 56 JUMP E.B., Weaver M.E.
The miniature pig in dental research
in: Swine in biomedical research, p. 543
Seattle USA:Fraysn Printing Co. 1966
- 57 KALICH J., KRUMBACHER K. und RUF B.
"Über die Erfahrungen bei Zucht und Haltung sowie
einige physiologische Daten des Hanford-Miniaturschweines"
Zeitschrift für die gesamte experiment. Medizin
145, 312 - 325 (1968)
- 58 KARMEN A., WROBLEWSKY F. and LA DUE J.S.
Transaminasenactivity in Human Blood
J.Clin. Invest. 34 (1955) 126
- 59 KARVINEN E., MIETTINEN M., KARVONEN M.
Fat-mobilizing activity of human fasting urine
Ann. Med. Exp. Fenn. 40, 263 (1932)

- 60 KATHER H., RIVERA M. and BRAND K.
Interrelationship and Control of Glucose Metabolism
and Lipogenesis in Isolated Fat-Cells
Biochem. J. 128, 1089 - 1096 (1972)
- 61 KEKWICK A., PAWAN G.L.S.
Effect of fat-mobilizing substanz in man
Lancet 1968 II, 198
- 62 KLENOW H. and EMBERLAND R.
The Enzymatic Reaktion between Ribose-1-Phosphat
and Glucose-1, 6-Diphosphat
Arch. Biochem. 58 (1955) 276
- 63 KORNACKER M.S. and BALL E.G.
Citrate Cleavage Enzyme in Adipose Tissue
Proc. Nat. Acad. Sci. 54 (1965) 899
- 64 KORNBERG A. and HORECKER B.L.
in: S.Colowick und N.Kaplan,
Methods in Enzymology, Band I,
p. 323, Acad. Press. 1955
- 65 KOSCHINSKY T. und GRIES F.A.
Glycerinkinase und Lipolyse des menschl.
Fettgewebes in Abhängigkeit vom relativen Körpergewicht

HOPPE-SEYLER's 2.Physiol. Chem. BD 352 S.430-432 März 1971
- 66 KREUTZ F.H.
Methoden für den Technikon-Autoanalyzer
- 67 LARDY H.A., LEE YA-PIN, AKIRA TAKEMORI
Enzyme Response to Thyreoid Hormones
Annals New York Acad. of. Scienses 86 (1960)

- 68 LEA M.A. and WALTER D.C.
"Factors Affecting Hepatic Glycolysis and some
Changes that Occur during Development"
Biochem. J. (1965) 94 pp. 655
- 69 LI CH., BARNAFI L., CHRETIEN M. and CHUNG D.
Isolation and Structure of beta-LPH from Sheep
Pituitary Glands
Experia Med. Intern. Congr. 112, 349 (1966)
- 70 LIND T., De GROOT, GAIL BROWN, CHEYNE G.A.
Observations on Blood Glucose and Insulin Determinations
British Medical Journal 3/320 - 323 Aug. 1972
- 71 LIPOVETZKY B.M., DIMITRIEVA J.J.
Non-esterified fatty acids in the blood and lipid-
mobilizing properties of the serum
Vop. med. Klin. 15, 25 (1969)
- 72 LIS M., GILARDEAU C., CHRETIEN M.
Relationsship between calcium transport and the lipolytic
effect of sheep beta-lipotropic hormone in adipose tissue
Acta endocr. 69, 507 (1972)
- 73 LIS M., GILARDEAU C., CHRETIEN M.
Fat cell adenylate cyclase by sheep beta-lipotropic hormone
Proc. Soc. exp. Biol. (N.Y.) 139, 680 (1972)
- 74 LOHMAR P., LI C.H.
Biological properties of ovine beta-lipotropic hormone
Endocrinology 82, 898 (1968)

- 75 LOHMAR P., LI C.H.
Studies on the biological properties of pituitary
lipotropin
Fed-Proc. 24, 295 (1965)
- 76 LOHMAR P., LI C.H.
Isolation of bovine beta-lipotropic hormone
Biochem-biophys Acta (Amst.) 147, 381 (1967)
- 77 LYDTIN H., PIEPER M., KUSUS T., SCHNELLE K., ZÖLLNER N.
Die Implantation von Verweilkathetern in die v. portae,
die v. cava, den rechten Vorhof und in den Magen des
Miniaturschweines
Z.ges.exp. Med. 149, 279 (1969)
- 78 MARSHALL M., LYDTIN H., KRAWIETZ W., HAGEN R., SCHUCKERT G.,
HESS H. und ZÖLLNER N.
Das Miniaturschwein als Versuchstier in der experimentellen
Medizin
Res. exp. Med. 157, 300-316 (1972)
- 79 MARSHALL M., LYDTIN H., KRAWIETZ W., SCHUCKERT G.,
LOHMÜLLER R., ZÖLLNER N.
Erfahrungen mit einer neuen Anaesthesie am Miniaturschwein
Zentralbl. Vet. Med. A, 19, 214 (1972)
- 80 MEHLER A., KORNBERG H., GISOLIA S. und OCHOA S.
The enzymatic Mechanism of Oxydation-Reductions between
Malate or Isocitrate and Pyruvate
J. Biol. Chem. 174, 961 (1948)
- 81 MERSMANN H.J., HONK J.M., PHINNEY G., UNDERWOOD M.C.
and BROWN L.J.
Lipogenesis in vitro liver and adipose tissue preparations
from neonatal swine
Am. Journal of Physiology Vol. 224, No 5, May 1973

- 82 MILLER E.A. and ALLEN D.O.
"Hormone-stimulated lipolysis in isolated fat cells
from 'young' and 'old' rats"
Journal of lipid Research Vol. 14 pp 331-336
- 83 WATELSON S., PINCUS J.B., RANNAZZISI G.
A rabbit serum calcium lowering factor from the pituitary
Clin. Chem. 9, 631 (1963)
- 84 NEUREUTHER Gertraud
Aufbau eines Radioimmunoassays für das lipotrope Peptid B
aus Schweinehypophysen
Inaugural-Dissertation-München 1975
- 85 PAUNE S.V. and MEAD J.F.
Inhibition of Enzyme Activities by Free Fatty Acids
J. Biolog. Chemistry Vol. 243 No 23
pp 6180 - 6185 (1968)
- 86 PARRY M.J. and WALKER D.G.
Purification and Properties of Adenosin 5-Triphosphat-D-Glucos
6-Phosphotransferase
Biochem. J. 99, 266 (1966)
- 87 PETTE D.
Plan und Muster im zellulären Stoffwechsel
Die Naturwissenschaften 52, 597 (1965)
- 88 PFLEIDERER G., GREIN L. und WIELAND Th.
"Spezifische Bestimmung der L-Alanin und Glutaminsäure
mit Hilfe der GPT"
Ann-Acad. Sci. fem. A 60, 381 (1950)

- 89 RABEN M.S., LANDOLD R., SMITH E.A., HOFFMANN K.
an YAJIMA H.
Adipokinetic Activity of Sythetic Peptides Related
to Corticotropin
Nature (Lond.) 189, 681 (1961)
- 90 RACKER E.
Spectrophotometric Measurement of Hexokinase and
Phosphohexokinase Activity
J. Biol. Chem. 167, 843 (1947)
- 91 ROBINSON J. and NEWSHOLME E.A.
Glycerol Kinase Activities in Rat Heart and Adipose Tissue
Biochem. J. 104, 2c
- 92 ROGNSTAD R. und KATZ J.
The balance of pyridine nucleotides and ATP in adipose tissue
Proc. Nat. Acad. Sci 55, 1148 (1966)
- 93 RUDMAN D., DEL RIO A., GARCIA L.A., BARNETT J.,
BIXLER Th. and HOLLINS B.
Lipolytic substances in bovine thyroid,
parotid and pineal glands
Endocrinology 87, 27 (1970)
- 94 RUDMAN D., DEL RIO A.E., GARCIA L.A., BARNETT J.,
HOWARD C.H., WALKER W. and MOORE G.
Isolation of two Lipolytic Pituitary Peptides
Biochem. J. 9, 99 (1970)
- 95 RUDMAN D. and DI GIROLAMO M. (1967)
Comparative studies on the physiology of adipose tissue
in: Advances of lipid Research, p.35
Editors: R.Paolotti and D.Kritchevsky
Academic Press, New York and London

- 96 RUDMAN D., HIRSCH R.L., KENDAL F.E., SEIDMAN F.
and BROWN S.J.
An Adipokinetic Component of the Pituitary Gland:
Purification, Physical, Chemical and Biological Properties
Recent Progr. in Hormone Research 18, 89 (1962)
- 97 RUDMAN D., REID M.B., SEIDMAN F., DI GIROLAMO M.,
WERTHEIM A.R. und BERN S.
Purification and Properties of a Component of the
Pituitary Gland which Produces Lipemia in the Rabbit
Endocrinology 68, 273 (1961)
- 98 RUDMAN D., SEIDMAN F., BROWN S., HIRSCH R.L.
Apokinetic activity of porcine fraction H in the rabbit,
guineapig, rat and mouse
Endocrinology 70, 233 (1962)
- 99 RUDMAN D., SEIDMAN F. and REID M.B.
Lipemia-Producing Activity of Pituitary Gland:
Separation of Lipemia-Producing Component from other
Pituitary Hormones
Proc. Soc. Exp. Biol. (N.Y.) 103, 315 (1960)
- 100 RUTTER W.J. and LARDY H.A.
Purification and Properties of Pigeon liver Malic Enzyme
J. Biol. Chem. 233 (1958) 374
- 101 SANWALD R. und WAGNER H.
Enzyme des Kohlehydrat-, Fett- und Eiweißstoffwechsels
in Gefäßen des Miniaturschweines
Z. ges. exp. Med. 145, 353 - 355 (1968)
- 102 SCHONER W.
Fettsäure-Oxydation und Regulation des Kohlenhydratstoffwechsels
Medizin und Ernährung 12, S.49-53

- 103 SCHWANDT P.
Spezial lipid mobilizing hormones from the pituitary gland (lipotropins)
Acta endocr., Suppl. 173, 177 (1973)
- 104 SCHWANDT P.
Die Lipotropine
Klin. Wschr. 52, 153-165 (1974)
- 105 SCHWANDT P., KARL H.J., THÜNER J., KNEDEL M.
Untersuchungen über eine lipolytisch wirksame Substanz aus Schweinehypophysen (Fraktion H)
Z. ges. exp. Med. 147, 246 (1968)
- 106 SCHWANDT P., WEISWEILER P., KRONE H. und DOERR H.W.
Zur Wirkung eines lipidmobilisierenden Peptids aus Schweinehypophysen bei verschiedenen Species
Klin. Wschr. 49, 437-439 (1971)
- 107 SCHWANDT P., WEISWEILER P., LAMERZ R.
Darstellung eines lipolytisch wirksamen Polypeptids (Pept. A.) aus Hypophysen vom Schwein
Z. ges. exp. Med. 155, 195 (1971)
- 108 SCHWANDT P., WEISWEILER P., PIEPER M., LYDTIN H., MARSHALL M.
In vivo Untersuchungen beim Miniaturschwein mit einem lipidmobilisierenden Polypeptid aus Schweinehypophysen
Res. exp. Med. 158, 246 (1972)
- 109 SCHWANDT P., WEISWEILER P., RUSCHEWSKI H. und HAGEN R.
Lipotrophic Peptides A und B from pig pituitary glands
Excerpta Medica, Amsterdam
Reprinted from International Congress Series No 315 (ISBN 90 219 02257)
The Regulation of the Adipose tissue mass, Marseilles, Juli 10-12, 1973

- 110 SCHWANDT P., WEISWEILER P., RUSCHEWSKI H., HAGEN R.,
LAMERZ R. und OTTO J.
Isolation, characterization and lipolytical action of
the pig pituitary Lipotropins Peptid A and Peptid B
Acta endocr. Suppl. 177, 204 (1973)
- 111 SCHWANDT P., WERNER S., KARL H.J.
Untersuchungen über biologische Wirkungen eines lipolytisch
wirksamen Peptids aus Schweinehypophysen (Fraktion H)
I. Einfluß auf die hormonempfindliche Triglyceridlipase
Z. ges. exp. Med. 148, 164 (1968)
- 112 SCHWANDT P., Werner S. und KARL H.J.
Untersuchungen über biologische Wirkungen eines
biologisch wirksamen Peptids aus Schweinehypophysen
(Fraktion H)
III. Wirkung auf Enzymaktivitäten in Fettgewebe und Leber
Z. ges. exp. Med. 149, 139-144 (1969)
- 113 SCHWANDT P., WERNER S., KNEDEL M., KARL H.J.
Untersuchung über Separierung und Wirkung der
lipolytischen Substanz (Fraktion H)
14. Symp. Dt. Ges. Endocrinol. S.307, Springer 1968
- 114 SHRAGO E., SPENETTA T., GORDON E.
Fatty acid synthesis in human adipose tissue
J. biol. Chem. 244, 2761 (1969)
- 115 SHAPIRO B., CHOWERS I. and ROVE G.
"Fatty Acid Uptake and Esterification in Adipose Tissue"
Biochem. and Biophys. Acta 23 pp 115 (1957)
- 116 SHRAGO E., SPENETTA T., GORDON E.
Fatty acid synthesis in human adipose tissue
J. biol. Chem. 244, 2761 (1969)

- 117 SLIFTER J., BARDEP D.H.
Inhibition in plasma of an experimental lipid mobilizer
Proc. Soc. exp. Biol. (N.Y.) 91, 42 (1956)
- 118 EISENSTEIN M.D.
Inter-relationship of Glucose and Lipid Metabolism
American Journal of Med. 26 No 5 pp 685-702 (1959)
- 119 ELBIN M.W., CORI G.T. and CORI C.P.
A comparative study of hexosephosphate from Yeast and Animal
Tissue
J. Biol. Chem. 184, 305 (1950)
- 120 SZENE P.A.
The Liver Lipogenic Enzyme
I. Distribution and Purification
J. Biol. Chem. 234, 2544 (1959)
- 121 TAMASI G., COEN G., GRAP L.
Effects of purine base-lipotropic hormones on lipid metabolism
Experientia (Basel) 25, 360 (1969)
- 122 TAKAKA A.K., PICKERING W. and LI C.H.
Relationship of Chemical Structure to In Vitro
Lipolytic Activity of Peptides Showing In Adrenocorticotrophic
and Melanocyte-stimulating-hormones
Arch. Biochem. 99, 296 (1962)
- 123 TAYLOR C.E., BAILLY E. and BARTLEY W.
Changes in hepatic lipogenesis during development of the rat.
Biochem. J. 105, 717 (1967)

- 124 TEPPERMAN H.M. and TEPPERMAN J.
The hexomorphosphat shunt and adaptive hyperlipogenese
Diabetes 7, 478 (1958)
- 125 TRYGSTAD O.
The lipid-mobilizing effect of some pituitary gland
preparations
Acta endocr. 58, 277 (1968)
- 126 TRYGSTADT O.
The lipid mobilizing effect of some pituitary gland
preparations
II.Preparation of a human pituitary lipid mobilizing
factor (LMF) with hypocalcaemic and hyperglycaemic effects
in rabbits
Acta endocr. 57, 81 (1968)
- 127 WEBER G. BANERJEE G., BIXLER D. and ASHMORE J.
Role of Enzymes in Metabolic Homeostasis
II.Depletion and Restoration of Avian liver Carbohydrate-
metabolizing Enzymes
J. Nutrition, 74, 157 (1961)
- 128 WEBER G. and SINGHAL R.L.
Role of Enzymes in Homeostasis
V.Actinomycin and Puromycin inhibition of cortisone-induced
Synthesis of hepatic Glucose -6- Phosphatase and Fructose
1,6 -Di- phosphatase
The Journal of BIOLOGICAL CHEMISTRY, Vol. 239 No 2, Feb. 1964
- 129 WEICHSELBAUM T.E.
Biuretmethode mit Photometer "Eppendorf"
Amer. J. Clin. Path. (Techn. Sect.) 10,40 (1946)

- 130 WEIL R., DE WITT, STETTEN
The urinary excretion of a fat mobilizing agent
J. biol. Chem. 168, 129 (1947)
- 131 WEISWEILER P.
Darstellung und Eigenschaften lipolytisch wirksamer
Polypeptide aus Hypophysen vom Schwein und vom Menschen
Inaugural-Dissertation München 1972
(I.Med.Klinik der Universität München)
- 132 WEISWEILER P. und SCHWANDT P.
Untersuchungen über zwei lipidmobilisierende Polypeptide
aus Hypophysen vom Schwein
Zeitschrift für Ernährungswissenschaft " Steroidhormone
und Fettstoffwechsel - Supplementum 12 - S.59
Dr. Dietrich Steinhoff-Verlag, Darmstadt (1974)
- 133 WIDDOWSON et al
Clin. Sci 10, 113 (1951)
- 134 WIELAND O. und SUYTER M.
Glycerokinase: Isolierung und Eigenschaften des Enzyms
Biochem. Z. 329, 320 (1957)
- 135 ZÖLLNER N. und TACCONI M.
Über die Konzentration einiger Lipoide in Serum und
Organen des Miniaturschweines und ihre Abhängigkeit
vom Alter
Z. ges. exp. Med. 145, 326-334 (1968)

Am 26. März 1948 wurde ich, Roland Anton H a g e n , als Sohn des Konstrukteurs Anton Hagen und dessen Ehefrau Irmgard, geb. Lutz, in Lustenau/Vorarlberg, Österreich, geboren.

1952 siedelten meine Eltern nach München um. Hier besuchte ich von 1954 - 1958 die Volksschule und anschließend die Oberrealschule (1958 - 1960 Luitpold-Oberrealschule, 1961 - 1967 Ludwigs-Gymnasium), die ich 1967 mit dem Abitur abschloß.

Im Sommersemester 1968 begann ich das Studium der Humanmedizin, das ich im Dezember 1973 mit dem Staatsexamen beendete.

Meine Medizinalassistentenzeit leistete ich an folgenden Kliniken ab:

- 1.2.1974 - 31.5.1974 Medizinische Poliklinik der Universität München bei Prof. Dr. med. H. Hess
- 1.6.1974 - 30.9.1974 Chirurgische Privatklinik Maria-Theresia am Bavariaring, München
- 1.10.1974 - 31.1.1975 I. Med. Klinik der Universität München

Vom 1. März 1975 bis 31. Dezember 1976 arbeitete ich als Wissenschaftlicher Assistent an der Medizinischen Poliklinik bei Prof. Dr. med. H. Hess in der Angiologischen Ambulanz.

Nachdem ich im Februar 1976 die deutsche Staatsbürgerschaft übernommen habe, bin ich seit dem 3. Januar 1977 Sanitäts-offizier bei der Deutschen Bundeswehr.

